

Analyse des beim X- chromosomalen Dystonie- Parkinson- Syndrom mutierten Gens, *DYT3*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

verfasst von:

Thilo Herzfeld

Gießen, September 2006

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Peter R. Schreiner

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller
Prof. Dr. rer. nat. Rainer Renkawitz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Dystonien	1
1.2 Das X-chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom (XDP)	2
1.2.1 Krankheitsbild	2
1.2.2 Neuropathologie	3
1.2.3 Erbgang	4
1.2.4 Das Transkriptionssystem <i>DYT3</i>	5
1.3 Retroelemente im menschlichen Genom	8
1.3.1 Humane endogene Retroviren	9
1.4 Regulation der Transkription	11
1.4.1 Der Polymerase II Promotor	11
1.4.2 Enhancer, Silencer und LCR	13
1.5 Zielsetzung	15
2 Material	16
2.1 Chemikalien	16
2.2 Lösungen und Puffer	17
2.3 Bakterienstämme und humane Zelllinien	18
2.4 Medien	19
2.5 Plasmide	20
2.6 Enzyme	21
2.7 Oligonukleotide	22
2.8 Kits	23
2.9 Laborgeräte	24
3 Methoden	25
3.1 Handhabung von Nukleinsäuren	25
3.1.1 Bestimmung der DNA- oder RNA- Konzentration in Lösungen	25
3.1.2 Fällung von DNA	25
3.1.3 Phenolextraktion	26
3.1.4 Isolierung von Plasmid- DNA	26
3.1.5 Isolierung von genomischer DNA	26

3.1.6 Isolierung von RNA	27
3.2 Methoden zur Klonierung	27
3.2.1 Klonierung der Luziferase- Reporter- Konstrukte	27
3.2.2 Klonierung von pGL3-Var3_639-TS	29
3.2.3 Klonierung der LTR- Enhancer Konstrukte	30
3.2.4 Klonierung von pCDNA3-MCS	32
3.3 Polymerase Kettenreaktion	33
3.3.1 Amplifikation der Promotor- Inserts	34
3.3.2 Screening der Klone	36
3.4 Synthese von cDNA	36
3.5 Sequenzierung	37
3.6 Gelelektrophorese	38
3.7 Kultivierung von Bakterien	39
3.7.1 Transformation von Bakterien	39
3.8 Zellkultur	39
3.8.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen	39
3.8.2 Transfektion	40
3.8.3 Ermitteln der Transfektionseffizienz bei NT2/D1 Zellen	41
3.9 „Northern Blot“	42
3.9.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	42
3.9.2 Herstellung und Markierung der β -Actin Sonde	43
3.9.2 Hybridisieren, Waschen und Exposition	44
3.10 Bestimmung der Luziferaseaktivität der unterschiedlichen Promotor- Konstrukte	45
3.10.1 Luziferaseaktivität der Variante 3 Promotor- Konstrukte	45
3.10.1.1 Induktion von HIF-1 α	46
3.10.1.2 Koexpression von Ikaros Isoform 2 und 8	46
3.10.1.3 Koexpression von MEF2C	47
3.10.2 Luziferaseaktivität der LTR Promotor- Konstrukte	47
3.10.3 Luziferaseaktivität der LTR Enhancer- Konstrukte	47
3.11 „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)	48
3.11.1 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Transkriptvariante 3	48
3.11.2 Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes durch PCR	49
3.11.3 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes des LTR- Promotors	50
3.12 Test auf Spleiß- Alterationen im Bereich <i>TAF1</i> Exon 18-19	53

4 Ergebnisse	54
4.1 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Transkriptvariante 3	54
4.1.1 5'- RACE zur Identifikation des Transkriptionsstartpunktes	54
4.1.2 Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes	58
4.2 Analyse des Variante 3 Promotors mit Hilfe von Luziferase Assays	60
4.2.1 Analyse verschieden langer Promotor Fragmente	60
4.3 Regulation des Variante 3 Promotors	63
4.3.1 <i>In silico</i> Identifikation putativer Transkriptionsfaktor- Bindemotive	63
4.3.2 Koexpression von Ikaros Isoform 2 und Isoform 8	63
4.3.3 Induktion von HIF-1	66
4.3.4 Koexpression von MEF-2C	69
4.4 Identifikation eines Exon 4 Gegenstrang- Transkripts	71
4.4.1 Homologie zwischen humanem und murinem Genom im Bereich zwischen den Genen <i>TAF1</i> und <i>OGT</i>	71
4.4.2 <i>In silico</i> Identifikation eines LTR mit putativer Promotoraktivität distal Exon 4	72
4.4.3 Analyse des putativen LTR Promotors	74
4.4.3.1 Nachweis der Promotoraktivität mit Hilfe von Luziferase Assays	74
4.4.3.2 Untersuchungen zur Enhanceraktivität des LTR	76
4.4.4 In vivo Nachweis des Gegenstrang Transkripts durch „Northern Blot“	79
4.4.4.1 Normalisierung der Blots durch β -Actin Hybridisierung	82
4.4.5 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes des Gegenstrang Transkripts	83
4.4.5.1 5'- RACE an Luziferase- Vektor- Transkripten	83
4.4.5.2 5'- RACE an Genom- Transkripten	87
4.5 Test auf Spleiß- Alterationen im Bereich <i>TAF1</i> Exon 18-19	89
5 Diskussion	91
5.1 Die <i>DYT3</i> Transkriptvariante 3	91
5.1.1 Der Variante 3 Promotor	92
5.1.2 Regulation des Promotors	94
5.1.2.1 Ikaros Koexpression	95
5.1.2.2 Hypoxie Induktion	98
5.1.2.3 MEF-2C Koexpression	100
5.2 Der LTR- Promotor distal Exon 4	101
5.2.1 Untersuchungen zur Enhanceraktivität	103

5.2.2 In vivo Nachweis eines Exon 4 Gegenstrang- Transkripts	105
5.2.3 Transkriptionsstartpunkte des Promotors	106
5.3 Weitere Untersuchungen zu den <i>DYT3</i> Transkriptvarianten	107
5.4 Ausblick	108
6 Zusammenfassung	110
7 Literaturverzeichnis	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin- resistent
AS	Aminosäure
Best. Nr.	Bestellnummer
bp	Basenpaare
cps	counts per second (Zählungen pro Sekunde)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribo- Nucleic- Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure Dinatriumsalz
EKA	Einzelkolonieausstrich
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
genom.	genomisch
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HERV	Human Endogenous Retrovirus (Humaner endogener Retrovirus)
Km ^R	Kanamycin- resistent
l	Liter
Lsg.	Lösung
min	Minute
ml	Milliliter
NaAc	Natriumacetat
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (Online Datenbank humaner Gene und genetischer Erkrankungen)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pol II	RNA Polymerase II
RLU/s	Relative Light Units per second (Relative Licht- Einheiten pro Sekunde)
RNA	Ribo- Nucleic- Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
S	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SNP	Single Nucleotide Polymorphism (auf einzelne Base beschränkter Polymorphismus)
TAF	TATA- Box Bindeprotein assoziierter Faktor
TBP	TATA- Box Bindeprotein
TBq	Terrabecquerel
V	Volt
Var3	Variante 3
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: XDP Patient mit oromandibulärer Dystonie und Torticollis.	2
Abb. 2: Krankheitsauslösender Bereich in Xq13.1.	5
Abb. 3: Das Transkriptionssystem <i>DYT3</i> .	7
Abb. 4: Schematische Darstellung eines endogenen Retrovirus.	10
Abb. 5: Position der Core- Promotor Elemente eines Pol II Promotors.	12
Abb. 6: Prinzip der „SMART RACE“.	55
Abb. 7: Bindestellen der für die RACE- PCR eingesetzten Primer.	56
Abb. 8: Ergebnis der Amplifikation mit Ex2V3-R5 und Universalprimer.	56
Abb. 9: Ergebnis der Amplifikation mit Ex2V3-R2 und Nested Universalprimer.	57
Abb. 10: Sequenzierung der 5' RACE Produkte.	57
Abb. 11: Darstellung der für die Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes verwendeten Primer.	58
Abb. 12: Test auf größere Exon 2 Verlängerungen.	59
Abb. 13: Klonierung der Variante 3 Promotor- Fragmente.	61
Abb. 14: Luziferaseaktivität der Variante 3 Promotor Fragmente relativ zu pGL3-Basic.	62
Abb. 15: Klonierung von pGL3-Var3_1644.	64
Abb. 16: Promotoraktivität in Ikaros kotransfizierten Zellen.	65
Abb. 17: Promotor- Fragmente zum Nachweis der Hypoxie- Induktion.	67
Abb. 18: Luziferaseaktivität bei HIF-1 Induktion.	68
Abb. 19: Promotoraktivität in MEF-2C kotransfizierten Zellen.	69
Abb. 20: Homologie zwischen humanem und murinem Genom im Bereich <i>TAF1</i> und <i>OGT</i> .	71
Abb. 21: Repeat- Bereiche um Exon 4.	72

Abb. 22: Putativer LTR Promotor.	73
Abb. 23: Klonierung der LTR Promotor- Fragmente.	74
Abb. 24: Luziferaseaktivität der LTR Promotor Fragmente relativ zu pGL3-Basic.	75
Abb. 25: Klonierung der LTR Enhancer Konstrukte.	77
Abb. 26: Luziferaseaktivität der Enhancer Konstrukte relativ zu pGL3-Basic.	78
Abb. 27: Darstellung der für die „Northern Blots“ verwendeten Sonden.	79
Abb. 28: Hybridisierung der Multiple Tissue Northern Blots mit LTR-Northern.	80
Abb. 29: Hybridisierung des Multiple Tissue Northern Blots mit LTR-Northern2.	81
Abb. 30: Normalisierung durch β - Actin.	82
Abb. 31: Klonierung eines 552 bp LTR- Promotor Fragments.	84
Abb. 32: LTR 5'- RACE Amplifikationen.	85
Abb. 33: Identifizierte Transkriptionsstartpunkte.	85
Abb. 34: Lokalisation der Primer für die LTR 5'-RACE.	87
Abb. 35: LTR 5'- RACE Amplifikationen an genomischen Transkripten.	88
Abb. 36: Sequenzierung der 210 bp Bande.	88
Abb. 37: DSC12 in <i>TAF1</i> Intron 18-19.	89
Abb. 38: Ergebnis der <i>TAF1</i> Exon 18-19 PCR.	90
Abb. 39: Schematische Darstellung der Ikaros Isoformen.	95
Abb. 40: Positionierung des TRE am Nukleosom.	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	16
Tabelle 2: Humane Zelllinien	18
Tabelle 3: Verwendete Plasmide	20
Tabelle 4: Verwendete Enzyme	21
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide	22
Tabelle 6: Verwendete Kits	23
Tabelle 7: Laborgeräte	24
Tabelle 8: Zellviabilität und Transfektionseffizienz bei NT2/D1 in Abhängigkeit von der Effectene-konzentration.	41
Tabelle 9: Hypoxie- regulierte Gene.	98

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit dem X- chromosomalen Dystonie- Parkinson- Syndrom, kurz XDP. Die folgende Einleitung soll einen Überblick über die Erkrankung und deren molekulargenetischen Hintergrund verschaffen. Zusätzlich erfolgt eine Einführung in für diese Arbeit relevanten Aspekte der Humangenetik.

1.1 Dystonien

Unter dem Begriff Dystonie fasst man Erkrankungen zusammen, die sich durch Bewegungsstörungen äußern [1]. Diese werden durch unwillkürliche Muskelkontraktionen verursacht und führen zu Verdrehungen, abnormaler Haltung der Extremitäten, des Rumpfes und Halses oder repetitiven Bewegungsabläufen (Tremor) [2,3]. Betroffen sind entweder einzelne (fokale Dystonie) oder mehrere benachbarte Körperteile (segmentale Dystonie). Ist der ganze Körper betroffen, so spricht man von generalisierter Dystonie. Zur weiteren Klassifizierung unterscheidet man primäre Dystonien, „Dystonie-plus“, heredodegenerative Dystonien und sekundäre Dystonien. Dabei ist die Dystonie bei der primären Form das einzige Symptom. Bei der „Dystonie-plus“ kommt ein weiteres Symptom hinzu, meist Parkinsonismus oder Myoklonus. Eine heredodegenerative Dystonie ist Teil einer umfassenden neurologischen Störung. Sekundäre Dystonien schließlich können sich im Rahmen anderer hereditärer, meist neurologischer Erkrankungen entwickeln und treten dann als Symptom dieser Erkrankung auf. Oftmals werden Sekundäre Dystonien aber auch von äußeren Faktoren wie Schlaganfällen, Tumoren oder Drogenmissbrauch ausgelöst [4].

Bislang sind 13 monogen vererbte Dystonien bekannt, die dementsprechend als DYT1 bis DYT13 bezeichnet werden [5]. Die Vererbung erfolgt autosomal dominant (DYT1, DYT4-13), autosomal rezessiv (DYT2) oder X chromosomal rezessiv (DYT3). Mit Ausnahme von DYT2 und DYT4 wurden die chromosomalen Loci bereits identifiziert. Die krankheitsauslösenden Gene und der molekulargenetische Hintergrund ist bei einigen Dystonien bekannt. So sei hier die Dopa-Responsive Dystonie (DRD; DYT5) genannt. Es handelt sich um eine Dystonie mit einem gleichzeitig oder später auftretendem Parkinsonismus. Wie der Name vermuten lässt, sind die meisten Patienten hervorragend mit L-Dopa behandelbar. Etwa 50-60 Prozent der Betroffenen haben eine Mutation im *GCH1* Gen, welches für GTP-Cyclohydrolase I codiert [6-10]. Auch bei DYT1 (autosomal dominant early-onset dystonia; idiopathic torsion dystonia) kennt man das

verantwortliche Gen. Fast alle Patienten haben eine GAG Trinukleotid- Deletion im Torsin A Gen, weshalb dem Protein eine funktionell wichtige Glutaminsäure fehlt [11].

1.2 Das X-chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom (XDP)

Das X-chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom, kurz XDP, (OMIM #314250) wurde erstmals 1976 von Lee *et al.* anhand von 28 Fällen auf der philippinischen Insel Panay beschrieben [12]. Das Syndrom wird innerhalb der primären Dystonien als Dystonie 3 (DYT3) bezeichnet.

1.2.1 Krankheitsbild

Die Erkrankung wurde von Fahn *et al.* mit dem philippinischen Wort „Lubag“ bezeichnet [13]. Übersetzt bedeutet dies soviel wie „verdreht“. Dies beschreibt anschaulich die mit der Dystonie einhergehende abnormale Haltung der betroffenen Körperteile.

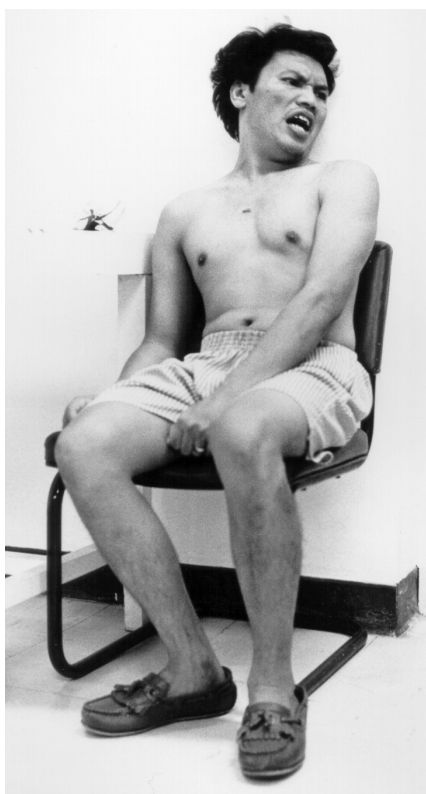


Abb. 1: XDP Patient mit oromandibulärer Dystonie und Torticollis.

Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft einen an XDP erkrankten Patienten mit oromandibulärer Dystonie und Torticollis.

Wie Untersuchungen anhand von 42 Patienten aus 21 Familien zeigten, äußert sich XDP zuerst in einem beschränkten Areal (untere oder obere Extremitäten, Axialmuskulatur oder Kopf) und generalisiert in 90 % der Fälle innerhalb von einem bis 11 Jahren nach Auftreten der ersten Symptome [14]. Die mittlere Dauer bis zur Generalisierung beträgt fünf Jahre. Bei einem Großteil der Patienten treten Gangstörungen (90 %), Dystonien der Beine (79 %), des Mundes bzw. Kiefers (oromandibulär) (64 %), des Halses (Torticollis) (57 %), sowie Blepharospasmen (Lidkrämpfe) (57 %) auf. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln 36 % der Betroffenen eine Parkinson-Symptomatik, teilweise einhergehend mit einer Abschwächung der Dystonie. Die Parkinson-Symptome umfassen Tremor, Bradykinesie (verlangsamte Bewegungen), Steifheit, Verlust der Haltungs- (posturalen) Reflexe und schlurfenden Gang. Es tritt mindestens eines der genannten Symptome auf. Auch eine verminderte Geruchswahrnehmung in Zusammenhang mit XDP wird vermutet [15].

Die ersten Krankheitssymptome treten für gewöhnlich im Erwachsenenalter auf. Der Durchschnitt liegt bei etwa 35 Jahren (Zeitspanne 12-64 Jahre) [16]. Die Verlaufsdauer beträgt bis zu 40 Jahre. Die Erkrankung führt ausnahmslos zum Tod. Die Betroffenen verhungern, da die Nahrung nicht mehr gekaut und geschluckt werden kann, ersticken an ihrer Zunge, oder sterben an Sekundärinfekten (hauptsächlich Lungenentzündungen).

Bislang ist keine erfolgversprechende medikamentöse Therapie bekannt [14]. Allerdings kann den Patienten durch Botulinum Toxin- Injektionen Linderung verschafft werden. Die Injektion erfolgt intramuskulär und führt zu einer Relaxation des Muskels. Hierbei handelt es sich um eine symptomatische Therapie, die nur bei einer fokalen Dystonie sinnvoll angewendet werden kann. Neurochirurgische Eingriffe zur symptomatischen Therapie wie Thalamotomie oder Palidotomie verliefen nur bedingt erfolgreich [12,17].

1.2.2 Neuropathologie

Das X-chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom ist eine neurodegenerative Erkrankung. Die dystonischen und parkinson- ähnlichen Symptome beruhen auf einer Muskel- fehlsteuerung. Neuropathologische Untersuchungen zeigten in Patienten- Gehirnen eine Atrophie im Bereich des Nucleus caudatus und Putamen [17,18]. Nucleus caudatus und Putamen bilden zusammen mit dem Nucleus accumbens das Striatum (deutsch: Streifenkörper) und sind Teil der Basalganglien des

Großhirns. Die Basalganglien sind für die Regulation von Bewegungsabläufen, insbesondere der Grobmotorik zuständig. Eine Störung im Bereich der Basalganglien kann zu einer Fehlsteuerung des Bewegungsapparates führen (z.B. bei Chorea Huntington) [19-21]. Mit Hilfe der Positronen Emissions- Tomographie konnte im Striatum von XDP- Patienten ein reduzierter Glucose-Stoffwechsel nachgewiesen werden [22]. Post mortem Analysen zeigten in den betroffenen Bereichen einen Verlust von Neuronen verbunden mit einer Astrogliose. Andere Regionen wie Cortex, Substantia nigra und Pons waren unauffällig [18,23].

Funktional setzt sich das Striatum aus zwei mosaikartig angeordneten Bereichen zusammen, dem Matrix- und dem Striosomen- Bereich [24,25]. Der Matrixbereich bildet zwei Signalwege (direkter und indirekter Signalweg), die als „Push-Pull“- System fungieren, um Bewegungen zu verstärken oder abzuschwächen. Zusätzlich gibt es einen dritten, striosomalen Signalweg. Vermutlich setzt eine korrekte Bewegungssteuerung eine aneinander angepasste Aktivität der drei Signalwege voraus [26]. Untersuchungen von Goto *et al.* konnten zeigen, dass der Striosomen- Bereich bei XDP Patienten mit Dystonie Symptomen degeneriert, der Matrix- Bereich jedoch intakt ist [27]. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung im Parkinson- Stadium war auch der Matrix- Bereich degeneriert. Die Degeneration wird verursacht durch einen Verlust an „medium spiny neurons“. Cholinerge Neuronen sind nicht betroffen.

1.2.3 Erbgang

Wie aus dem Namen bereits ersichtlich, handelt es sich bei XDP um eine X- chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Formalgenetisch gezeigt wurde dies zuerst 1990 von Kupke *et al.* durch neurologische Untersuchungen und Segregationsanalysen in 21 philippinischen Familien [28]. Von XDP betroffen sind fast ausschließlich Männer, allerdings wurden auch vereinzelt erkrankte Frauen beschrieben [29,30]. Diese hatten im Vergleich zu den Männern einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp mit einem milderem Krankheitsverlauf und späterem Ausbruch der Krankheit. XDP ist eine hauptsächlich auf den Philippinen anzutreffende Erkrankung, die auf einen „Gründereffekt“ zurückzuführen ist (engl. „founder effect“). Das heißt, alle Betroffenen sind Nachfahren eines einzigen Menschen, bei dem die krankheitsauslösende Mutation entstanden ist. Daraus resultiert eine Homogenität des krankheitsauslösenden Allels. Dies, zusammen mit der fast vollständigen Penetranz erleichtert die Suche nach den molekularbiologischen Ursachen der Krankheit. XDP könnte möglicherweise als Modell für andere, nicht monogen vererbte Dystonien dienen und dabei helfen das Wissen über die molekularen Vorgänge im Bereich der Basalganglien zu erweitern.

Der Ursprung des X- chromosomalen Dystonie- Parkinson- Syndroms liegt vermutlich auf der philippinischen Insel Panay. Hier ist die Praevalenz (die Häufigkeit) mit 4,77 Erkrankten pro 100000 Einwohner verglichen mit anderen Regionen höher [28,31]. Die absolut höchste Praevalenz wurde für die auf Panay gelegene Provinz Capiz ermittelt. Von 100000 Einwohnern litten durchschnittlich 21,94 Personen an XDP. Dies entspricht einer Häufigkeit von etwa 1/4000. Obwohl XDP philippinischen Ursprungs ist, wurde die Erkrankung auch in anderen Ländern nachgewiesen [32]. Allerdings waren die Patienten ausnahmslos philippinischer Abstammung, sodass anzunehmen ist das auch diese Fälle auf den „Gründereffekt“ zurückzuführen sind.

1.2.4 Das Transkriptsystem *DYT3*

Durch Kopplungsanalysen konnte der XDP- Locus *DYT3* auf den proximalen- langen Arm des X- Chromosoms eingegrenzt werden [33-35]. Zytogenetische Analysen zeigten bei Patienten keine Chromosomenabberation [36]. Die Mutation musste folglich im subchromosomalen Bereich zu suchen sein. Durch weitere Untersuchungen konnte schließlich der krankheitsauslösende Bereich auf eine etwa 400 kbp große Region innerhalb der chromosomalen Bande Xq13.1 eingegrenzt werden [37-40]. Flankiert wird die Region proximal von dem Marker DXS10016 und distal von DXS559 (Abb. 2).

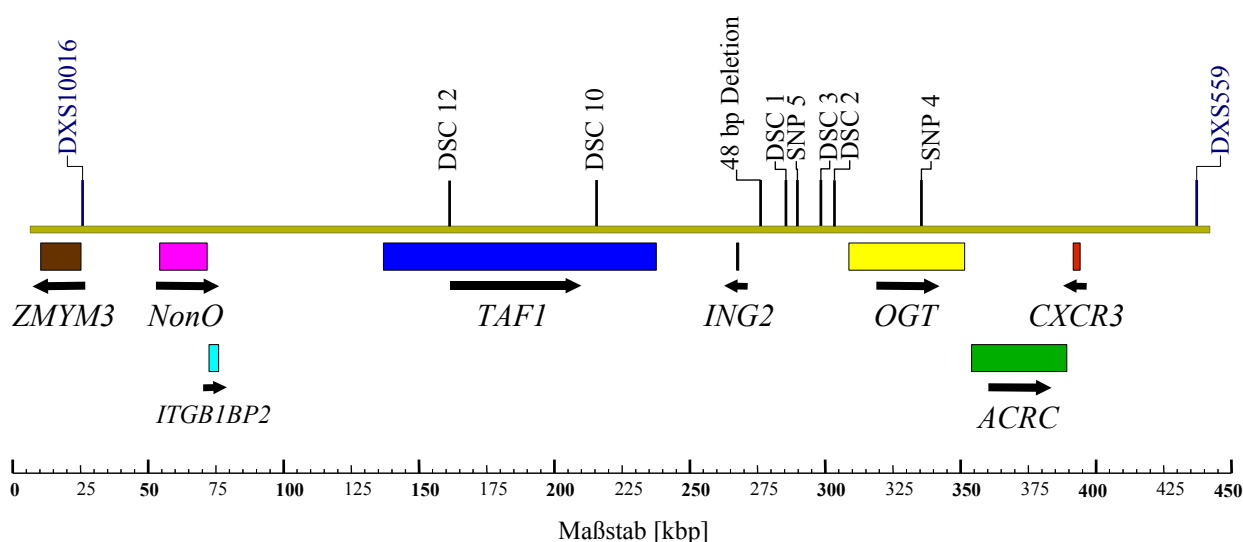


Abb. 2: Krankheitsauslösender Bereich in Xq13.1. Dargestellt ist der etwa 400 kbp umfassende krankheitsauslösende Bereich in Xq13.1 zwischen den polymorphen Markern DXS10016 und DXS559. Die Region umfasst acht bekannte Gene, deren Transkriptionsrichtung durch Pfeile symbolisiert wird. Außerdem werden die Positionen der patienten- spezifischen Mutationen gezeigt.

Der Bereich zwischen den Markern umfasst acht Gene, die als XDP Kandidatengene in Frage kommen und deren Funktion bereits teilweise aufgeklärt ist. Das Gen *ZMYM3* (früher *DXS6673E*) codiert für ein Zinkfinger Protein unbekannter Funktion und wird in Verbindung mit Mentaler Retardierung gebracht [41,42]. *NonO* codiert für das RNA- Bindeprotein p54^{nrb} [43] und *ITGB1BP2* für das muskelspezifische Melusin [44]. Das *TAF1* Gen (früher *CCG1*) codiert für die 250 kDa Untereinheit des „TATA- Box Bindeprotein Assoziierter Faktor 1“. Dieser spielt eine wichtige Rolle im Bereich der Transkriptionsaktivierung der RNA Polymerase 2, sowie der Steuerung des Zellzyklus [45,46]. Das *TAF1* Gen wird alternativ gespleißt und codiert zwei Isoformen, wobei Isoform 2 intern 21 Aminosäuren fehlen. Ein weiteres Gen im XDP- kritischen Bereich ist *ING2* (oder auch *INGX*) [47,48]. Es handelt sich um ein putatives Tumor Suppressor- Gen ähnlich *ING1* (inhibitor of growth) mit einem PHD- Finger (plant homeodomain) Motiv. Desweiteren finden sich noch die Gene *OGT* (O-linked N-acetylglucosamine transferase) [49], *ACRC* (codiert für ein nukleäres Protein mit saurem Repeatbereich) [50] und *CXCR3*, welches für den CXC Chemokinrezeptor 3 codiert [51]. *ACRC* spielt möglicherweise eine Rolle bei der Transkript-Elongation [52].

Durch Sequenzierungen wurde überprüft, ob in diesen Genen krankheitsspezifische Mutationen vorhanden sind. Dies konnte ausgeschlossen werden [39,40,50,53]. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Exon- Bereiche. Intergenische Mutationen, sowie Mutationen in Introns wurden dabei nicht erfasst. Die für das X- chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom krankheitsrelevante Mutation musste folglich in einem regulatorischen Bereich, einem Intron oder einem bislang unbekannten Gen lokalisiert sein.

Deshalb wurde bei einem Patienten nahezu die vollständige Kandidatengen- Region sequenziert. Lediglich der hoch repetitive Bereich zwischen den Genen *ITGB1BP2* und *TAF1* konnte nicht sequenziert werden. Es wurden bislang unbekannte Mutationen identifiziert ([54] sowie unveröffentlichte Daten). Diesen Mutationen wurden in weiteren 46 XDP- Patienten, sowie 178 philippinischen Kontrollpersonen (männlich und weiblich; insgesamt 208 X- Chromosomen) gesucht. Es zeigte sich, dass sieben SNPs, sowie eine 48 bp Deletion ausschließlich in Patienten nachgewiesen werden konnten. Diese Mutationen sind folglich krankheits- spezifisch. Dabei waren zwei Mutationen (SNP 4 und SNP 5) in Patienten polymorph, nicht jedoch in den Kontrollen. Dies zeigt, dass SNP 4 und 5 auf Mutationen in XDP Krankheitsträgern zurückzuführen, und deshalb vermutlich nicht krankheitsrelevant sind.

Die restlichen fünf XDP- spezifischen Basenaustausche wurden DSC 1, DSC 2, DSC 3, DSC 10 und DSC 12 (disease-specific single-nucleotide change) genannt (Abb. 2). Diese DSC sind, zusammen mit der 48 bp Deletion, die einzigen Patienten- spezifischen Mutationen. Folglich

müssen ein oder mehrere DSC krankheitsauslösend sein.

Neben den 178 philippinischen Kontrollpersonen wurden auch 180 kaukasische, 80 japanische und 60 kubanische Personen (insgesamt 629 X- Chromosomen) getestet. Bei keiner dieser Kontrollen wurden DSCs gefunden. Bei zwei kubanischen Kontrollen fand sich eine, der 48 bp Deletion ähnliche, jedoch nicht identische Deletion.

Bei der näheren Analyse der Polymorphismen zeigte sich, dass bis auf zwei Ausnahmen alle DSC in repetitiven Genombereichen (ALU, LINE und L1MB1) lokalisiert sind. DSC 12 befindet sich in einem nicht- repetitiven Bereich in *TAF1* Intron 18. DSC 3 befindet sich in einem nicht- repetitiven Bereich, der Homologie zu dem auf Chromosom 18 lokalisierten *SOCS6* oder *CIS4* Gen aufweist, einem Zytokin- Signalisierungshemmer mit C- terminaler SH2- und SOCS- Domäne [55]. Aus diesem Grund wurde nach bislang unbekannten Transkripten im Bereich um DSC 3 gesucht.

Mit Hilfe von RT- PCR Amplifikationen mit Primern im Bereich um DSC 3 und mit Hilfe von Phagenbank- Screenings konnten mehrere zuvor unbekannte Exone identifiziert werden (Abb. 3) [54].

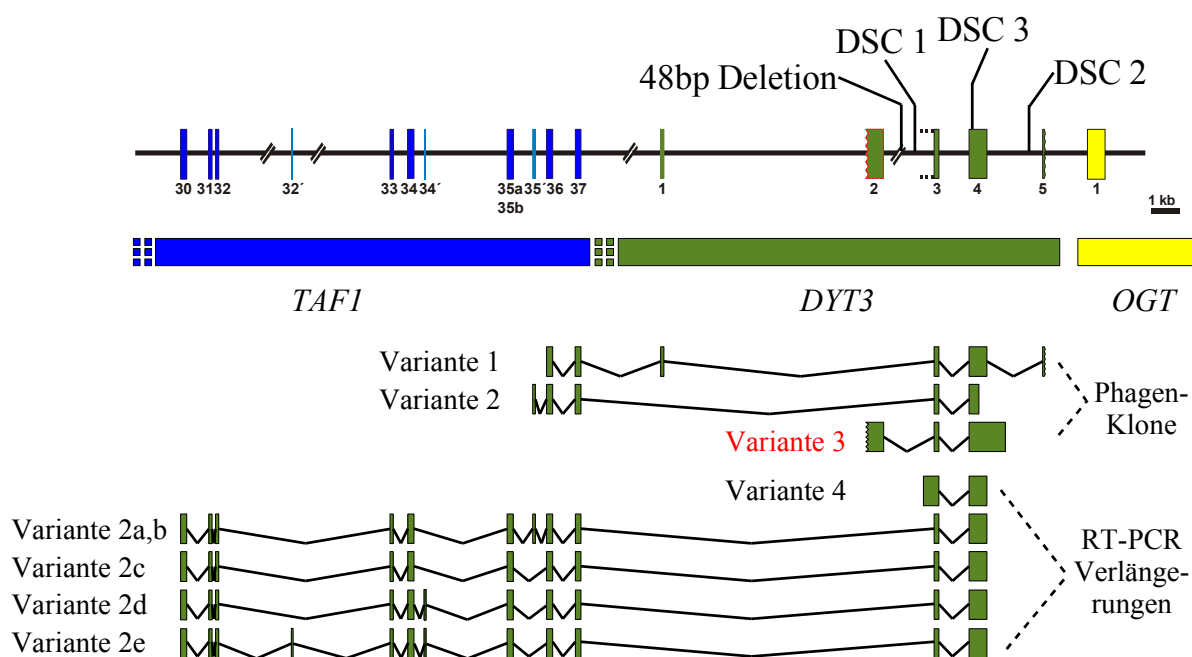


Abb. 3: Das Transkriptsystem *DYT3*. Dargestellt sind die neu entdeckten Exone 1-5 (grün) sowie 32', 34' und 35' (hellblau). Im unteren Bereich der Abbildung sind die verschiedenen Transkriptvarianten gezeigt.

Fünf der neu entdeckten Exone befinden sich im Bereich zwischen den Genen *TAF1* und *OGT*. Sie wurden von eins bis fünf durchnummeriert und als *DYT3* Exone benannt (in Abb. 3 grün

dargestellt). Das *DYT3* Exon 2 überlappt teilweise mit dem *ING2* Gen, welches sich allerdings im Gegenstrang befindet (vgl. Abb. 2).

Es wurden jedoch auch Exone nachgewiesen, die im *TAF1* Transkriptbereich lokalisiert sind, jedoch im Zusammenhang mit *TAF1* bislang nicht beschrieben wurden. Diese Exone wurden ihrer Position im *TAF1* Gen entsprechend als Exon 32', 34' und 35' definiert.

Alle neu beschriebenen Exone bilden ein alternativ gespleißtes Transkriptsystem, das sich aus mindestens vier Hauptvarianten und mehreren Untervarianten zusammensetzt (Abb. 3). Die Transkriptvarianten wurden als Variante 1 bis 4 definiert. Neben diesen Hauptvarianten gibt es innerhalb der Variante 2 mehrere Untervarianten (2a-e).

Die Hauptvarianten 1 und 2, sowie die Untervarianten 2 a-e nutzen auch *TAF1* Exone. Bei Variante 3 und 4 kann dies nicht ausgeschlossen werden, da es sich bei den in Abbildung 3 dargestellten Transkripten nicht um die vollständigen Transkripte handelt. Die 5'- und 3'- Bereiche sind bislang unbekannt. So konnte, wie bislang unveröffentlichte Arbeiten unserer Gruppe zeigen, Variante 2 um weitere *TAF1* Exone in 5'- Richtung verlängert werden. Alle bislang entdeckten Transkriptvarianten nutzen die *DYT3* Exone 3 und 4. Die XDP- spezifische Mutation DSC 3 befindet sich in Exon 4 und ist damit die einzige Mutation in einem Exon.

Dies zeigt den momentanen Stand der Forschung. Die Funktion der *DYT3* Transkriptvarianten ist bislang unbekannt. Welcher der DSCs, oder die 48 bp Deletion krankheitsauslösend sind, ist nicht bekannt. Allerdings ermöglichen es diese Polymorphismen bereits heute, XDP zuverlässig molekulargenetisch zu diagnostizieren. Damit steigen die Chancen der Früherkennung und möglicherweise auch der Erfolg einer zukünftigen Therapie.

1.3 Retroelemente im menschlichen Genom

Das menschliche Genom besteht aus etwa 20000 bis 25000 proteincodierenden Genen [56]. Die codierenden Bereiche umfassen jedoch lediglich 1,2 % des gesamten euchromatischen Genoms. Dies ist deutlich weniger als bei Prokaryonten. So ist z.B. das Genom des häufig im Labor eingesetzten *E. coli* Stammes K12 zu 87,8 Prozent proteincodierend [57]. Die überwiegende Mehrheit des eukaryotischen Genoms besteht nicht aus proteincodierenden Bereichen. So besteht etwa die Hälfte des Säugetier- Genoms aus sogenannten transponierbaren Elementen, die sich in Transposons und Retroelemente gliedern [58]. Diese Elemente werden oft auch als „selfish DNA“ oder „Mobile Elemente“ bezeichnet, was deren Fähigkeit sich selbst zu kopieren beschreibt. Die

Retroelemente benötigen hierzu eine RNA- Zwischenstufe, die mit Hilfe einer Reversen Transkriptase wieder zu DNA umgeschrieben wird. Der überwiegende Teil der „selfish DNA“ besteht aus Retroelementen (42,2 %), während der Anteil der Transposons im menschlichen Genom nur bei etwa 2,8 % liegt. Die funktionelle Bedeutung transponierbarer Elemente wurde lange unterschätzt. So wurde ursprünglich angenommen, sie hätten keine Funktion. Daher bezeichnete man sie auch als „Junk- DNA“. Heute kennt man die wichtige Bedeutung transponierbarer Elemente. So dienen sie oftmals als alternative Promotoren oder regulieren die Expression naheliegender Gene. Auch geht man davon aus, dass sie eine wichtige Rolle bei der Evolution des Genoms spielen [59-62].

1.3.1 Humane endogene Retroviren

Die Gruppe der Retroelemente teilt sich in LTR- und nicht- LTR- Elemente. Zur größeren Gruppe der nicht LTR- Elemente gehören die „long interspersed nuclear elements“ (LINE) zu denen L1 und L2 repeats gehören, die „short interspersed nuclear elements“ (SINE) zu denen Alu und MIR repeats gehören, sowie Pseudogene [63]. Zur Gruppe der LTR- Elemente gehören Sequenzen retroviralen Ursprungs, die zusammen etwa acht Prozent des menschlichen Genoms ausmachen [64]. Sie umfassen verschiedene Klassen endogener Retroviren sowie Retrotransposons und andere retrovirale Sequenzen.

Humane endogene Retroviren (HERV) sind retrovirale Genome oder Teile davon, die durch Infektionen der Keimbahn stabil in das humane Genom integriert sind, und damit nach mendelschen Regeln vererbt werden [65]. Strukturell gleichen endogene Retroviren mit ihren zwei flankierenden „Long Terminal Repeats“ (LTR) ihren exogenen Verwandten (Abb. 4). Die Größe vollständiger Proviren beträgt etwa 8 bis 9 kbp. Intern enthalten sie Sequenzen, die homolog zu den retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* sind und für die viralen Proteine wie Hüllproteine oder reverser Transkriptase codieren. Allerdings sind meist die codierenden Fähigkeiten dieser Gene durch Deletionen oder eine Anhäufung von Mutationen im Laufe der Evolution verloren gegangen. Es gibt jedoch auch funktionell codierende endogene Retroviren, wie z.B. HERV-K Proviren, welche Viruspartikel produzieren können. Diese sind jedoch aufgrund von Hüllprotein- Mutationen nicht infektiös [66]. In diesem Zusammenhang sei auch das Protein Syncytin genannt, ursprünglich ein HERV-W Hüllprotein, das für die Funktion der Syncytiotrophoblasten und damit für die Abgrenzung des foetalen Gewebes von der Plazenta essentiell ist [67,68].

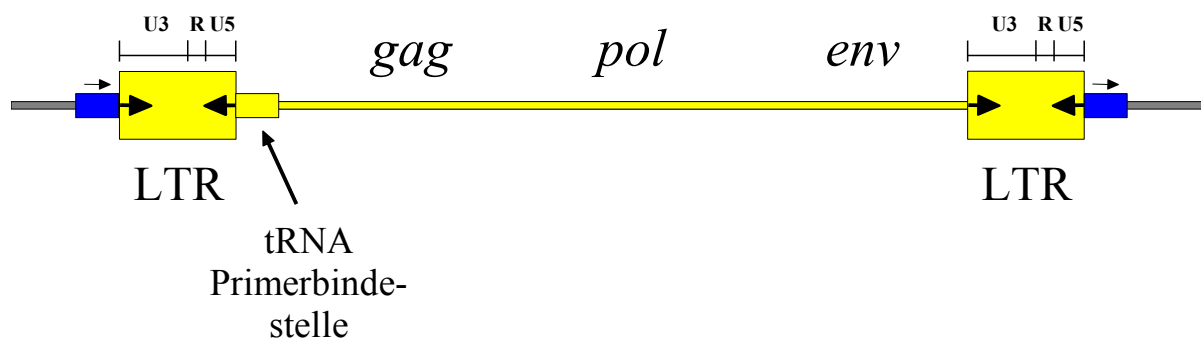


Abb. 4: Schematische Darstellung eines endogenen Retrovirus. Retrovirale Sequenzen sind gelb und zelluläre Sequenzen grau dargestellt. Das virale Genom enthält die Gene *gag*, *pol* und *env* und wird flankiert von zwei identischen long terminal repeats (LTR). Diese LTR besitzen an ihren Enden kurze, invertierte repeats (Pfeile). Außerdem ist eine tRNA Primerbindestelle vorhanden, um die reverse Transkription zu primen. Durch Integration eines Provirus in das Genom entsteht eine etwa 4-6 bp große Duplikation der zellulären DNA (blauer Balken).

Humane endogene Retroviren werden für gewöhnlich anhand einer tRNA Primerbindestelle, welche für die reverse Transkription essentiell ist, klassifiziert [65]. Zur Bezeichnung wird der „Einbuchstaben- Aminosäurecode“ verwendet. So haben z.B. HERV-K eine Bindestelle für eine Lysin- tRNA. Desweiteren werden endogene Retroviren in drei Klassen unterteilt. In Klasse I werden alle HERV zusammengefasst, die Homologie zu Gamma- Retroviren, wie dem Moloney Leukämievirus (MLV) aufweisen. Klasse II umfasst HERV mit Ähnlichkeit zu Beta- Retroviren (z.B. mouse mammary tumor virus; MMTV) und Klasse III umfasst HERV mit eingeschränkter Homologie zu Spumaretroviren.

Die Integration viraler Sequenzen ist nicht auf Eukaryonten beschränkt, sondern wurde auch bei Prokaryonten nachgewiesen [69]. Alle bislang beim Menschen untersuchten HERV findet man auch in höheren Primaten und Altweltaffen, die meisten jedoch nicht in Neuweltaffen [65]. Dies lässt darauf schließen, dass die meisten HERV während der Primatenentwicklung vor etwa 30 Millionen Jahren in das Genom integriert worden sind, was in etwa dem Zeitpunkt der Trennung von Alt- und Neuweltaffen entspricht. Eine Ausnahme bilden HERV-L und MaLR, die 70 bis 100 Millionen Jahre zurückverfolgt werden können. Dies deutet auf eine Etablierung in Vorfahren der Eutheria (Plazenta-Säuger) hin [70,71].

Wie bereits erwähnt, besteht das menschliche Genom zu etwa acht Prozent aus Sequenzen retroviralen Ursprungs. Allerdings handelt es sich bei den meisten retroviralen Elementen nicht um vollständige oder zumindest trunkierte endogene Retroviren, sondern lediglich um deren LTR. Homologe Rekombination zwischen den 5'- und 3'- LTR führt zur Entfernung der viralen Gene aus

dem Genom. Es bleibt lediglich ein einzelnes LTR übrig. Dieser Mechanismus scheint während der Evolution häufig stattgefunden zu haben, da wesentlich mehr eigenständige LTR als komplette HERV im humanen Genom vorkommen [65]. Während sich die Zahl vollständiger HERV im haploiden Genom je nach Virustyp auf ein paar Dutzend beschränkt, finden sich oftmals mehrere tausend Kopien des dazugehörigen LTR.

Diese „Long Terminal Repeats“ können sowohl Promotor- als auch Enhanceraktivität besitzen [72, 73]. Außerdem sind sie für die Replikation des viralen Genoms essentiell [74]. Die Aktivität des Promotors bzw. die Stärke des Enhancers ist oft zellspezifisch. Heute kennt man einige zelluläre Gene, die ein LTR Element als einzigen oder alternativen Promotor besitzen und die Expression gewebespezifisch reguliert wird [75-77]. Strukturell setzen sich LTR aus einer U3, R und U5-Region zusammen. Die größte Region, die U3-Region (Unique 3') beinhaltet die für die Aktivität des Promotors essentiellen Motive (z.B. TATA-Box), sowie Motive, die eine zelltyp-spezifische Regulation ermöglichen [78]. Die R-Region (Repeat Region) ist etwa 15 bis 250 Nukleotide lang und beinhaltet den Transkriptionsstart, sowie oftmals ein Polyadenylierungssignal [79]. Die U5-Region umfasst etwa 70 bis 250 Nukleotide und grenzt an die tRNA Primerbindestelle an. Die U5-Region besitzt Sequenz-Motive, die für eine effiziente Polyadenylierung des viralen Transkripts im 3' LTR essentiell sind [80].

1.4 Regulation der Transkription

Die korrekte Steuerung der Genexpression ist für den Zellstoffwechsel und damit für den gesamten Organismus von fundamentaler Bedeutung. Neben der Anpassung an äußere Faktoren, wie etwa die Sauerstoffkonzentration, muss die Genexpression bei vielzelligen Eukaryonten zelltypspezifisch und auch zeitlich (z.B. während des Zellzyklus oder der Embryogenese) exakt gesteuert sein. Die Expression wird hierbei von bestimmten Sequenzabschnitten, den Promotoren, getrieben. Diese sind den eigentlichen (protein)codierenden Sequenzen vorgeschaltet.

1.4.1 Der Polymerase II Promotor

Die Transkription, also das Umschreiben der DNA in RNA, erfolgt mit Hilfe einer RNA Polymerase. Bei Eukaryonten kennt man drei verschiedene RNA Polymerasen (I bis III). Die RNA

Polymerasen I und III transkribieren die rRNA- und tRNA- Gene, während RNA Polymerase II (Pol II) proteincodierende Gene transkribiert. RNA Polymerasen setzen sich aus einer Vielzahl von Untereinheiten zusammen, wobei das RNA Polymerase II Holoenzym die meisten Untereinheiten (annähernd 60 Polypeptide) besitzt [81].

Die minimale, für eine basale Expression nötige Sequenz wird als Core- Promotor bezeichnet [82]. Der Polymerase II (Pol II) Core- Promotor enthält für gewöhnlich ein oder mehrere konservierte Motive wie TATA- Box, Inr- Element (Initiator Element), BRE (TFIIB Recognition Element) und DPE (Downstream Promoter Element), welche für die korrekte Positionierung und Orientierung der Transkriptions- Maschinerie wichtig sind [81,83]. Dabei befinden sich diese Motive in einem definierten Abstand zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 5).

Die Transkription wird in verschiedene Phasen unterteilt. Zuerst bildet die Polymerase zusammen mit den basalen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH den sogenannten Prä- Initiierungskomplex (PIC) im Bereich des Core- Promotors. Der Transkriptionsfaktor TFIIB kann dabei an das BRE binden, während TFIID an die TATA- Box, sowie an das INR- Element und das DPE binden kann. TFIID setzt sich zusammen aus dem TATA- Box Bindeprotein (TBP), sowie TATA- Box Bindeprotein assoziierten Faktoren (TAF). TFIID orientiert sich so, dass das TBP an der TATA- Box, und TAF1 und TAF2 im Bereich des Inr binden [84,85]. TAF6 und TAF9 positionieren sich im Bereich des DPE [86].

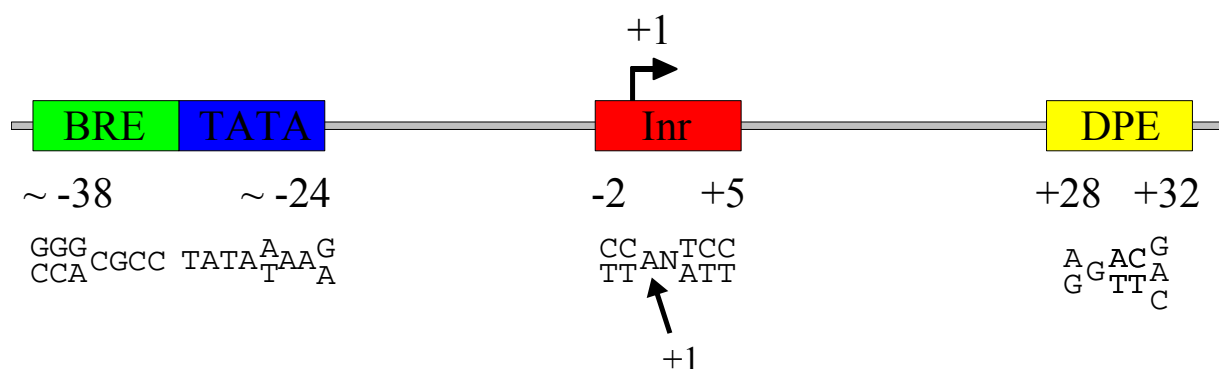


Abb. 5: Position der Core- Promotor Elemente eines Pol II Promotors. Die Elemente sind als farbige Boxen dargestellt. Darunter sind die Positionen relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1) angegeben. Die Positionen des BRE und der TATA- Box sind im Gegensatz zum Inr und DPE nicht nukleotidgenau festgelegt. Unter den Boxen sind die entsprechenden Konsensussequenzen gezeigt. Pol II Promotoren enthalten für gewöhnlich nur einen Teil (oder keines) dieser Motive.

Nachdem die Transkriptions- Maschinerie am Core- Promotor gebunden ist, erfährt sie eine drastische Konformationsänderung, bei der der DNA- Doppelstrang im Bereich des Transkriptionsstartpunktes auf einer Länge von etwa 10 bis 15 Nukleotiden geschmolzen wird [87]. Hierfür sind

TFIIE und TFIIH notwendig [88]. Der so einzelsträngige Matrizen- Strang wird in das Aktive Zentrum der RNA Polymerase transportiert. Diesen Zustand nennt man „Offener Komplex“. In der nun folgenden Initiierungsphase, wird die RNA nach Vorgabe des Matrizen- Stranges synthetisiert. Dabei kommt es oft zum Abbruch der Synthese nach etwa 3 bis 10 Basen [89,90]. Erreicht die RNA eine Länge von etwa 30 Nukleotiden, so verliert die Polymerase den Kontakt zum Core- Promotor (promoter clearance). Es beginnt die Elongations- Phase, bei der die RNA unter Zuhilfenahme von Elongations- Faktoren bis schließlich zur Termination verlängert wird [91].

Neben den für die Transkription essentiellen basalen Transkriptionsfaktoren gibt es eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren, die aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken und so in einem komplexen Zusammenspiel die Genaktivität regulieren. Diese Transkriptionsfaktoren können an Faktor- spezifische Konsensusmotive binden, welche sich für gewöhnlich proximal des Core- Promotors befinden.

Für die Transkription ist es erforderlich, dass die Transkriptions- Maschinerie einen Kontakt zum Core- Promotor herstellen kann. Jedoch ist die DNA bei Eukaryonten im Chromatin (einem Komplex aus DNA, Histon- und Nichthiston- Proteinen) organisiert. Dabei ist die DNA unterschiedlich stark gepackt. Bei hoher Packdichte spricht man von Heterochromatin und bei niedriger Packdichte von Euchromatin. Eine hohe Packdichte erschwert es der Transkriptions- Maschinerie Kontakt zum Core- Promotor herzustellen und die Transkription zu initiieren. Viele Transkriptionsfaktoren regulieren die Stärke der Transkription, indem sie durch Histon- Modifikationen lokal die Packdichte des Chromatins ändern und so den Zugang der Polymerase zur DNA erleichtern oder erschweren [92]. Die Modifikation erfolgt mit Hilfe von Coregulatoren (Coaktivator oder Corepressor) am N- terminalen Bereich der Histone. Man unterscheidet vier Klassen Histon- modifizierender Coregulatoren, Histon- Acetyltransferasen, Histon- Deacetylasen, Histon- Methyltransferasen und Histon- Kinasen. Neben der Regulation über Histon- Modifikationen gibt es Transkriptionsfaktoren, die mit Hilfe eines modular aufgebauten Mediators die Aktivität der Transkriptions- Maschinerie beeinflussen [93-95]. Die Regulation erfolgt hier durch Phosphorylierung der C- terminalen Domäne der RNA Polymerase II.

1.4.2 Enhancer, Silencer und LCR

Neben dem eigentlichen Core- Promotor und den proximal angeschlossenen regulatorischen Bereichen, wird die Expression vieler Gene zusätzlich durch weiter entfernt liegende Sequenzabschnitte beeinflusst. Diese Bereiche werden, je nach Effekt, als Enhancer oder Silencer

bezeichnet. Bereits 1981 konnte gezeigt werden, dass ein 72 bp großes repetitives Sequenzelement aus dem SV40 Genom ausreichend ist, die Expression eines klonierten Hämoglobin- Gens um den Faktor 200 zu steigern [96]. Dabei war es unerheblich, wo sich das Element befand. Auch die Orientierung hatte keinen Einfluss auf den verstärkenden Effekt. Dies entspricht der gängigen Definition eines Enhancers/Silencers als cis- regulatorisches Element, dessen Wirkung orts- und orientierungsunabhängig ist. Die Entfernung vom Promotor kann mehrere zehntausend Basen betragen [97]. Vermutlich aufgrund dieser hohen Distanz gibt es im Genom sogenannte „Insulator“- Elemente (Isolierende Elemente). Diese können die Enhancer- Reichweite begrenzen, um unerwünschte Effekte auf angrenzende Gene zu verhindern [98].

Zur Funktionsweise von Enhancern nimmt man an, dass der Enhancer und der Core- Promotor durch Schleifenbildung der DNA in engen Kontakt zueinander gebracht werden [99]. Die an den Enhancer gebundenen Proteine können so in direkten Kontakt zur Transkriptionsmaschinerie treten und die Transkription verstärken. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Enhancer basale Transkriptionsfaktoren, sowie die Polymerase rekrutieren können. Dieser Komplex stellt den Kontakt zum Core- Promotor entweder durch direkte Schleifenbildung oder durch einen „Tracking“- Mechanismus, der auch zu einer Schleifenbildung führt, her [100].

Neben Enhancern gibt es weitere transkriptions- verstärkende Elemente, die Locus- Kontrollregionen (LCR). Diese sind komplexer aufgebaut als Enhancer und besitzen im Gegensatz zu diesen mehrere DNase I hypersensitive Regionen [101,102]. LCR können die Aktivität mehrerer Gene über eine große Distanz gewebespezifisch und zeitlich exakt steuern. Die regulierten Gene sind dabei in einem Gencluster organisiert.

Die wahrscheinlich am besten untersuchte LCR befindet sich stromaufwärts des β - Globin Genclusters und umfasst fünf DNase hypersensitive Regionen, die für sich genommen Enhancer- oder Insulator- Eigenschaften aufweisen. Diese LCR reguliert die Aktivität der humanen β - Globin Gene, die während der Embryonalentwicklung zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen aktiv sind. Dabei sind die β - Globin Gene auf dem Chromosom in der gleichen Abfolge organisiert, in der sie aktiviert werden. Die Deletion der β - Globin LCR führt zu einem fast vollständigen Verlust der β - Globin Genexpression, wie verschiedene Formen der Thalassämie zeigen [103].

Die Funktionsweise der LCR ist noch nicht vollständig bekannt. Die Genaktivierung erfolgt durch Lockerung der Chromatinstruktur in einem größeren Bereich, als dies z.B. bei Enhancern der Fall ist. Wie dies zustande kommt ist nicht abschließend geklärt. Hier werden Schleifenbildungs- oder „Linking“- Mechanismen diskutiert [104,105].

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur weiteren Analyse des bei XDP mutierten Transkriptsystems *DYT3* zu leisten. Bislang lässt sich nicht vorhersagen, welche der von Nolte *et al.* identifizierten Mutationen krankheitsauslösend sind [54]. Die Mutationen könnten das pre-mRNA Spleißen beeinflussen, zu einem Aminosäureaustausch in einem bislang unbekannten Protein führen, oder eine Fehlregulation der Expressionsrate hervorrufen. Eine systematische Analyse wäre mit einem enormen Aufwand verbunden, weshalb es sinnvoll erscheint zuerst das Transkriptsystem näher zu charakterisieren, um so die krankheitsauslösende Mutation näher eingrenzen zu können.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtet sich auf die Transkriptvariante 3 und deren Regulation. Zunächst war zu klären, ob es sich um ein *TAF1*- Exon unabhängiges Transkript mit eigenständigem Promotor handelt. Die Regulation dieses Promotors sollte hinsichtlich möglicher XDP relevanter Mechanismen untersucht werden. Zusätzlich sollte nach weiteren putativ transkriptionsregulativen Elementen gesucht, und diese näher analysiert werden.

In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob die XDP- spezifische Mutation DSC12 zu Spleiß- Veränderungen führen könnte. Die Sequenz bei DSC12 stellt eine putative Branch- Site dar, die durch die Mutation zerstört würde.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Katalog- Nr.</i>
2- Mercaptoethanol	Fluka Chemie GmbH; 9471 Buchs (Schweiz)	63689
50 Base- Pair Ladder	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855-1327 USA	27-4005-01
Agar- Agar	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	11393
Agarose	Inno-TRAIN GmbH; 61477 Kronberg	GX04004
Ampicillin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	A-0166
Bacto- Trypton	BD; Sparks, MD 21152 USA	211705
Bacto Hefeextrakt	DIFCO (BD); Sparks, MD 21152 USA	212750
Betain	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	B-0300
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA 94547 USA	500-0006
Borsäure	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.00165.1000
Bromphenolblau Na- Salz	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	15375
BSA	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	A2153-50g
Chloroform	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	X984.1
Coomassie brilliant blue R-250	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	12553
Cryo- safe I	ccpro GmbH; 67433 Neustadt	KM-11-V
Dulbecco's PBS (10x)	PAA Laboratories GmbH; 4061 Pasching; Österreich	
Essigsäure	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.00058.2500
Ethidiumbromid Lösung	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.11608.0030
Ethylendiamin- tetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	E-5134
Ethanol	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	9065.4
Ficoll 400	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	F-4375
Foetales Kälberserum	ccpro GmbH; 67433 Neustadt	S-10-L
Formamid	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	6749.1
Glycerin	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.04094.1000
Glycin	Plisone Pharmacia Biotech AD, Uppsala, Sweden	17-1323-01
Isobutanol	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.00988.1000
Isopropanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	I-9516
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	5033.1000

Chemikalie	Hersteller	Katalog- Nr.
Kanamycin	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	26898
L- Glutamin 200 mM	ccpro GmbH; 67433 Neustadt	Z-10-M
LMP Agarose	GIBCO BRL; Gaithersburg, MD 20898 USA	5517UB
Methanol	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	4627.6
Molecular Weight Marker For Peptides	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	MW-SDS-17S
Na ₃ citrat · 2 H ₂ O	Honeywell Riedel-de Haën GmbH; 30926 Seelze	25116
Natriumacetat (NaAc)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.01539.0500
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	3957.1
Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	PEQLAB GmbH; 91052 Erlangen	20-2010
Penicillin/ Streptomycin Lsg.	ccpro GmbH; 67433 Neustadt	Z-13-M
Phenol	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	0038.1
Phenol/Chloroform	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	A156.1
Polyvinylpyrrolidon	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	PVP-360
Ponceau S	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	5938.1
rRNasin	Promega Corporation; Madison, WI 53711 USA	N2511
Temed	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	2367.3
Tetranatrium Pyrophosphat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	P-9146
Tris	Carl Roth GmbH & CO. KG; 46185 Karlsruhe	4855.2
Tris-Cl	USB; Cleveland, Ohio 44128 USA	22676
TrypLE Express	GIBCO BRL; Gaithersburg, MD 20898 USA	12605-010
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.09057.1000
Sephadex G-50 Superfine	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855-1327 USA	17-0041-01
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	20783
Xylencyanol	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	10590.0005

2.2 Lösungen und Puffer

- 0,15 M NaCl
- 0,2 M und 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- 10 M KOH
- 2 x SSC; 0,1 % SDS
- 3 M Natriumacetat (pH 5,5)
- 40 mM Tetranatrium Pyrophosphat
- 6 x SSC; 0,1 % SDS

- Bromphenolblau Lösung: 0,005 g/l Bromphenolblau Na- Salz in 10 % Ethanol
- Ladepuffer 10x für Agarosegele: 20 % Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1 % SDS; 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol
- Northern (Prä)hybridisierungspuffer: 6 x SSC; 5 x Denhardt Solution; 0,1 % SDS
- Ponceau S Lösung: 0,5 g Ponceau S; 1 ml Essigsäure; ad H₂O 100 ml
- SSC Puffer 20x (pH 7,0): 3 M NaCl; 0,3 M Na₃citrat · 2 H₂O
- TBE Puffer 10x: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0
- TE Puffer: 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

2.3 Bakterienstämme und humane Zelllinien

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Stamm Top10 verwendet. Dieser eignet sich für allgemeine Klonierungen einschließlich blau- weiß Selektion und hat folgenden Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien.

Tabelle 2: Humane Zelllinien

<i>Name</i>	<i>ATCC Nr.</i>	<i>Ursprung</i>	<i>isoliert aus</i>
NT2/D1	CRL-1973	Malignes pluripotentes Embryonalkarzinom (Testis)	Metastase (Lunge)
U87	HTB-14	Glioblastom/ Astrozytom	-
Lymphoblastoide Zelllinien	-	Lymphozyten aus gesunden und erkrankten Philippinos	Immortalisiert mit EBV

2.4 Medien

Für die Anzucht von Bakterienkulturen (*E. coli*) wurde ausschließlich Luria- Bertani- Vollmedium (LB- Medium) verwendet.

10 g Bacto- Trypton
10 g NaCl
5 g Bacto Hefeextrakt
ad H₂O 1000 ml

Für die Herstellung von Agar- Platten wurden zusätzlich pro 1000 ml Medium 15 g Agar- Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren (121 °C, 1 bar, 20 min) wurde das Medium auf 60 °C abgekühlt, der pH mit 10 M KOH auf 7,5 eingestellt und bei Bedarf Ampicillin oder Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben.

Für die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden je nach Zelltyp unterschiedliche Medien eingesetzt. Es wurden ausschließlich Medien der Firma ccpro GmbH (67433 Neustadt) verwendet .

Lymphoblastoide Zellen: RPMI 1640 (Best. Nr. FM-16-L)

NT2/D1: DMEM; 4,5 g/l Glukose, 1,5 g/l Natriumbicarbonat (Best. Nr. FM-99L)

U87: DMEM; 4,5 g/l Glukose (Best. Nr. FM-13I)

Zusätzlich wurde jedes Medium mit 10 % (v/v) Foetalem Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) 200 mM L- Glutamin supplementiert. Außerdem wurde 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin Lsg. zugegeben. Das Foetale Kälberserum wurde vor Gebrauch für 30 Minuten auf 56 °C erhitzt um die Proteine im Serum zu denaturieren.

2.5 Plasmide

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 3 gelisteten Plasmide verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Vektor- Backbone</i>	<i>Relevanter Genotyp/ Konstruktion</i>	<i>Quellenangabe</i>
pGL3-Basic	pGL3	Amp ^R , Luziferase- Vektor zum Klonieren eigener Promotor- Inserts	Promega; Madison, WI 53711 USA
pGL3-Promoter	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit SV40 Promotor	Promega; Madison, WI 53711 USA
pGL3-Control	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit SV40 Promotor und SV40 Enhancer	Promega; Madison, WI 53711 USA
pGL3-LTR_552	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 552 bp LTR-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-LTR_521	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 521 bp LTR-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-LTR_162	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 162 bp LTR-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-LTR_105	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 105 bp LTR-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-LTR-Neg	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 521 bp LTR-Promotor Insert in antisense Orientierung	Diese Arbeit
pGL3-Var3_1644	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 1644 bp Var3-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-Var3_639	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 639 bp Var3-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-Var3_639-TS	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 545 bp Var3-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-Var3_253	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 253 bp Var3-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-Var3_137	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 137 bp Var3-Promotor Insert	Diese Arbeit
pGL3-Var3-Neg	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 639 bp Var3-Promotor Insert in antisense Orientierung	Diese Arbeit
pGL3-Basic_LTRenh_s	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 521 bp LTR-Promoter Insert stromabwärts des Luziferase Gens	Diese Arbeit
pGL3-Basic_LTRenh_as	pGL3	Amp ^R , pGL3-Basic mit 521 bp LTR-Promoter Insert stromabwärts des Luziferase Gens in antisense Orientierung	Diese Arbeit
pGL3-Var3_639_LTRenh_s	pGL3	Amp ^R , pGL3-Var3_639 mit 521 bp LTR-Promoter Insert stromabwärts des Luziferase Gens	Diese Arbeit
pGL3-Var3_639_LTRenh_as	pGL3	Amp ^R , pGL3-Var3_639 mit 521 bp LTR-Promoter Insert stromabwärts des Luziferase Gens in antisense Orientierung	Diese Arbeit

Plasmid	Vektor- Backbone	Relevanter Genotyp/ Konstruktion	Quellenangabe
Hypoxie- Reporter	pGL2	Amp ^R , Promotor aus <i>VEGF</i> . SP1 und AP2 Motive mutiert	[106]
pMT2	pMT2	Amp ^R	[107]
pMEF2C-1.6	pMT2	Amp ^R ; MEF-2C Leserahmen in pMT2	[107]
pCDNA3-MCS	pCDNA3	Amp ^R , Kloniert aus pCDNA3-IK2. Der IK2 Leserahmen wurde durch <i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I Verdau entfernt	Diese Arbeit
pCDNA3-IK2	pCDNA3	Amp ^R , Ikaros Isoform 2 in pCDNA3	[108]
pCDNA3-IK8	pCDNA3	Amp ^R , Ikaros Isoform 8 in pCDNA3	[108]
pCR-Blunt II-TOPO		Km ^R , Klonierungsvektor für „Blunt End“ Klonierungen	Invitrogen; Carlsbad, CA 92008 USA
pCR 2.1-TOPO		Amp ^R , Km ^R , Klonierungsvektor für Taq PCR- Produkte	Invitrogen; Carlsbad, CA 92008 USA
pEGFP	pPD16.43	Amp ^R , GFP Expressionsplasmid	Clontech; Mountain View, CA 94043 USA

2.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Name	Typ	Hersteller
<i>Bam</i> HI, <i>Bst</i> API, <i>Bst</i> XI, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Nco</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Ssp</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xmn</i> I	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs; Ipswich, MA 01938-2723 USA
AMV Reverse Transkriptase	Reverse Transkriptase	Promega Corporation; Madison, WI 53711 USA
BD PowerScript	Reverse Transkriptase	BD Biosciences; Palo Alto, CA 94303-4230 USA
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	Alkalische Phosphatase	New England Biolabs; Ipswich, MA 01938-2723 USA
DNA Polymerase I (Klenow)	DNA Polymerase/ 3'-5' Exonuklease	New England Biolabs; Ipswich, MA 01938-2723 USA
HotStarTaq Plus	DNA Polymerase	Qiagen GmbH; 40724 Hilden
<i>Pfu</i> Turbo	DNA Polymerase	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA
<i>Pfu</i> Ultra	DNA Polymerase	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA
T4 DNA Ligase	Ligase	Roche Diagnostics GmbH; 68305 Mannheim

<i>Name</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
T4 Polynukleotidkinase	Kinase	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855-1327 USA
<i>Taq</i> Polymerase	DNA Polymerase	Qiagen GmbH; 40724 Hilden

2.7 Oligonukleotide

Die in Tabelle 5 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma- Aldrich Chemie GmbH in 89552 Steinheim geliefert.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>
LTRProm-F	AACAAGCTTAGTGGGTTGCTACTACTG
LTRProm-F_Neg	AAACTCGAGAGTGGGTTGCTACTACTG
LTRProm-F2	AACAAGCTTACACAGCTTCCACGGTGTGG
LTRProm-515R	AAACTCGAGATGAGACCCGGGCTGGTG
LTRProm-515R_Neg	AACAAGCTTATGAGACCCGGGCTGGTG
LTRProm-156R	AAACTCGAGATGGACCAATTAGCACCTT
LTRProm-99R	AAACTCGAGTCAGCAGGACATGGGTGG
Var3Prom-R	AACAAGCTTCCTTTGCTGAGGTGCAGG
Var3Prom-R_Neg	AAACTCGAGCCTTTGCTGAGGTGCAGG
Var3Prom-1644F	GGTCTCGAGTATTTGAAGGATCCTGTCTG
Var3Prom-1644F_OS	AGGTGACTATATTTGAAGGATCCTGTCTG
Var3Prom-633F	AAACTCGAGAGGTTTCAGGTGTGTGTGG
Var3Prom-633F_Neg	AACAAGCTTAGGTTTCAGGTGTGTGTGG
Var3Prom-247F	AAACTCGAGTGCCTCAGCCTCCCGAATAG
Var3Prom-131F	AAACTCGAGTCTCCTGACCTCGTGATCCGAC
GLprimer2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
RVprimer3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
LTR-Northern	AGGACTACAGTGAGGATTGTGGAGGGAAGTGGACCTT
LTR-Northern2	AGTATCCTCATCTGGCAGAACTCCCATAGGGTGTGCTC
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
1664Seq-F	TTATAGGCGTGAGCCACCAAGCTG
1644Seq-F2	TGGAATGCAGTGGCACGATCTCAG
1664Seq-R	ACAATACAGGAGGTGCTGCC
1644Seq-R2	AGCTTGCAGTGAGCCAAGGTCG

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>
1644Seq-R3	AGGGATGGGAGTGATTCTCTTTGCC
Luc-R	TGTCGTTTCGCGGGCGCAACTGCAAC
TAF_EX_18-F	GATGCTGGCTATGGTGAGAAATCC
TAF_EX_19-R	ACATAGGAGAATCCTTCACCACAC
Ex2V3-R2	GCCCAAGGAGAAGAAAGCCCAGAC
Ex2V3-R5	AGGCGTGAGTTAGCCGGGCT
Ex2V3-F3	TCCTGCACCTCAGCAAAGGTGG
Ex2V3-F4	TCTCCTGACCTCGTGATCCGAC
LTR12-F4	GGAGAGCCTGTGCGGCTGCATC
LTR12-F5	AGGTGGTTCTGGAGTTGGTTCC
HBActin-F	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG
HBActin-R	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2.8 Kits

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 6 angegebenen Kits verwendet. Die in den Kits enthaltenen Reagenzien werden nicht gesondert aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Katalog- Nr.</i>
BD SMART RACE cDNA Amplification Kit	BD Biosciences; Palo Alto, CA 94303-4230 USA	634914
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems ; Foster City, CA 94404 USA	4336917
Dual- Luciferase Reporter Assay System	Promega Corporation; Madison, WI 53711 USA	E1910
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	301425
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	12362
Forever 100 bp Ladder Personalizer	Seegene BioCat GmbH; 69120 Heidelberg	FBLP-2003
Megaprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855-1327 USA	RPN1604
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	51104
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	27106
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	28706
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	28106
QIAshredder	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	79656

Kit	Hersteller	Katalog- Nr.
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	74107
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen; Carlsbad, CA 92008 USA	45-0640
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen; Carlsbad, CA 92008 USA	45-0245

2.9 Laborgeräte

In der Tabelle 7 werden die verwendeten Laborgeräte aufgelistet. Es wird darauf verzichtet Standard- Laborgeräte wie z.B. Magnetrührer aufzuführen, da hier keine experimentelle Relevanz zu erwarten ist.

Tabelle 7: Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Cryo-Einfriergerät	Cryo- Einfriergerät NU200	Nunc GmbH & Co. KG; 65201 Wiesbaden
DNA/ RNA Quantifizierung	GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ 08844 USA
Hybridisierungs- ofen	Typ30 SpecialHyb	Bachofen Laboratoriumsgeräte GmbH; 72770 Reutlingen
Luminometer	Sirius Luminometer	Berthold Technologies GmbH & Co.KG; 75323 Bad Wildbad
Photometer	Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ 08844 USA
Sequenzierer	ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems ; Foster City, CA 94404 USA
Tischzentrifuge	Biofuge fresco mit Rotor 75003328 (24 x 1,5/2,0 ml)	Heraeus Holding GmbH; 63450 Hanau
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400	PerkinElmer; Wellesley, MA 02481-4078 USA
Videoprinter	Video Copy Processor P68E	Mitsubishi Electric Europe; 40880 Ratingen
Zentrifuge	Multifuge 3L-R mit Rotor #6444	Heraeus Holding GmbH; 63450 Hanau
Zentrifuge	RC 5B Plus mit Rotoren GSA und SS34	Sorvall (Thermo Electron; 63505 Langenselbold)

3 Methoden

Das folgende Kapitel führt die in dieser Arbeit angewandten Methoden auf und beschreibt die Durchführung der einzelnen Experimente. Bei der Verwendung von Kits wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Deshalb wird in diesem Fall auf eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung verzichtet. Lediglich die vom Protokoll abweichenden oder für das allgemeine Verständnis wichtigen Schritte werden genannt.

3.1 Handhabung von Nukleinsäuren

3.1.1 Bestimmung der DNA- oder RNA- Konzentration in Lösungen

Die DNA- oder RNA- Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit Hilfe eines „GeneQuant II“ Gerätes der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Zur Messung wurde das Gerät auf die richtige Messmethode (DNA oder RNA) eingestellt und dann eine nukleinsäurefreie Probe (H_2O) zur Festlegung der Referenz in das Gerät gestellt. Anschließend wurden 1 μl der zu messenden Lösung in 99 μl nukleinsäurefreier Referenzlösung verdünnt und im Gerät gemessen. Die Ausgabe erfolgte direkt als Konzentrationsangabe. Außerdem konnte durch die Ausgabe des Quotienten der OD bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Probe ermittelt werden. Der Wert sollte hier etwa bei 1,8 liegen.

3.1.2 Fällung von DNA

Generell wurde DNA mit Hilfe von Ethanol (EtOH) gefällt. Hierfür wurden der Probe 1/20 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,5 und anschließend 3 Vol. EtOH zugegeben und kurz gemischt. War das Probenvolumen kleiner als 50 μl , so wurden zuvor bis 50 μl H_2O zugegeben und dann gefällt. Falls der durch die Fällung bedingte Verlust an DNA möglichst gering gehalten werden sollte (z.B. bei nur wenig Ausgangsmaterial), so wurde der Ansatz für 30 min bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurde bei 13000 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Minuten zentrifugiert, dann der Überstand abgegossen und das Pellet mit eiskaltem 80 % EtOH gewaschen. Nach Lufttrocknung von etwa 10 Minuten wurde das Pellet im gewünschten Volumen und Puffer resuspendiert.

3.1.3 Phenolextraktion

Um Proteine aus Lösungen zu entfernen, wurden Phenolextraktionen durchgeführt. Bei geringen Probenvolumina wurde zuerst auf mindestens 200 µl mit entsprechendem Puffer aufgefüllt. Sollte DNA aus LMP Agarose extrahiert werden, so wurde der Agaroseblock zuerst durch Zugabe von 5 Vol. TE- Puffer und Erhitzen auf 65 °C gelöst. Anschließend wurde 1 Vol. Phenol zugegeben und eine Minute gemischt. Anschließend wurde die Probe zur Phasenauftrennung für fünf Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Vol. Phenol/ Chloroform- Gemisch zugegeben. Wieder wurde eine Minute gemischt und fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde 1 Vol. Chloroform zugegeben, eine Minute gemischt und fünf Minuten zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und die darin befindliche DNA in einem letzten Schritt gefällt.

3.1.4 Isolierung von Plasmid- DNA

Für die allermeisten Anwendungen wurde Plasmid- DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen isoliert. Als Ausgangsmaterial wurden 4 ml *E. coli* TOP10 Übernachtskultur eingesetzt (für Sequenzierungen nur 2 ml).

Wurde die Plasmid- DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen benötigt, so wurde die Präparation mit Hilfe des „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) durchgeführt. Dieser Kit bietet den Vorteil, dass hier bakterielle Endotoxine nahezu vollständig entfernt werden, was zu einer höheren Überlebensrate der transfizierten Zellen führt. Als Ausgangsmaterial wurden 100 ml *E. coli* TOP10 Übernachtskultur eingesetzt.

3.1.5 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer Wildtyp- DNA wurde der „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 200 µl eigenes Blut (Thilo Herzfeld) eingesetzt.

3.1.6 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt- RNA wurde der „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Es wurden pro Reaktion etwa 10^7 Zellen mit Hilfe des „QIAshredder“ Kits (Qiagen) homogenisiert und für die RNA Isolierung eingesetzt. Zum vollständigen Verdau von genomischer DNA wurde das von Qiagen vertriebene „RNase-Free DNase Set“ wie vorgeschrieben in das Protokoll integriert.

3.2 Methoden zur Klonierung

Für die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Luziferase- Reporter- Vektoren mussten verschiedene Promotor- Fragmente in den Luziferase- Vektor pGL3-Basic kloniert werden. Außerdem musste der Ikaros 2 codierende Leserahmen aus pCDNA3-IK2 entfernt werden, um für den Versuch einen Kontrollvektor zu erhalten.

3.2.1 Klonierung der Luziferase- Reporter- Konstrukte

Für die Klonierung der Luziferase- Reporter- Konstrukte wurden zuerst verschieden lange Promotor- Fragmente aus genomischer DNA mit Hilfe von PCR amplifiziert. Dabei beinhalteten die für die PCR eingesetzten Primer Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* oder *XhoI*. Die detaillierten PCR- Protokolle finden sich in Kapitel 3.4.

Die PCR Produkte wurden gefällt und die Pellets zur Restriktion aufgenommen in:

2 µl	NEB 2
0,2 µl	BSA (100x)
1 µl	<i>HindIII</i>
1 µl	<i>XhoI</i>
15,8 µl	H ₂ O

20 µl	

Inkubiert wurde bei 37 °C über Nacht.

Anschließend wurden die Proben über ein LMP Agarose- Gel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mittels Phenolextraktion isoliert.

Der Restriktionsverdau des Vektors (pGL3-Basic) erfolgte in einem Volumen von 150 µl:

6,66 µl	pGL3-Basic (20 µg)
15 µl	NEB 2
1,5 µl	BSA (100x)
3 µl	<i>Hind</i> III
3 µl	<i>Xho</i> I
120,84 µl	H ₂ O

150 µl	

Inkubiert wurde bei 37 °C für 5,5 Stunden mit anschließender Inaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten. Dann wurden dem Ansatz 3 µl Alkalische Phosphatase (CIP) zugegeben um die Vektorenden zu dephosphorylieren. Die Probe wurde in einem LMP Agarose- Gel aufgetrennt, die Vektorbande ausgeschnitten und die DNA mittels Phenolextraktion isoliert.

Zur Ligation der Promotor- Fragmente mit dem Vektor wurde wie folgt vorgegangen:

1 µl	Ligase Puffer (10x)
2 µl	dATP (10 mM)
1 µl	T4 Ligase
1 µl	Vektor (400 ng)
1 µl	Insert (≈ 300 ng)
4 µl	H ₂ O

10 µl	Inkubation für 4 Stunden bei 15 °C

Anschließend wurden 25 µl kompetente *E. coli* TOP10 mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert. Der Transformationsansatz wurde komplett auf selektive LB- Agarplatten (50 µg/ml Spectinomycin) aufplattiert und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden pro Konstrukt mehrere Klone über Einzelkolonieausstriche vereinzelt.

Das Screening der Klone erfolgte mittels PCR und ist in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als letzter Schritt wurden die Inserts der ermittelten Positiv- Klone sequenziert und ein fehlerloser Klon ausgewählt. Die Vektoren werden anhand der Länge und Art ihres Promotor- Inserts benannt.

3.2.2 Klonierung von pGL3-Var3_639-TS

Für die Klonierung von pGL3-Var3_639-TS wurde der Vektor pGL3-Var3_639 *Bst*XI und *Hind*III geschnitten.

3 µl pGL3-Var3_639 (3 µg)

5 µl NEB 2

1 µl *Bst*XI

1 µl *Hind*III

30 µl H₂O

50 µl inkubiert bei 37 °C über Nacht

Anschließend wurde gefällt und die Vektorenden mittels Klenow-Fragment begradigt.

1,5 µl Vektor (550 ng)

0,2 µl Klenow (1 U)

6,6 µl dNTPs (100 pmol/µl)

2 µl NEB 2

9,7 µl H₂O

20 µl inkubiert bei 25 °C für 15 Minuten

Dann wurde 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben und das Enzym bei 75 °C für 20 Minuten inaktiviert. Der Ansatz wurde über ein Agarose Gel aufgetrennt und die Vektorbande ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert und dann gefällt.

Anschließend wurde der Vektor rezirkularisiert.

5 µl Vektor- DNA

1 µl Ligase Puffer (10x)

2 µl dATP (10 mM)

1 µl T4 Ligase

1 µl H₂O

10 µl inkubiert bei 15 °C für 4 Stunden

Die Transformation, das Screening und die Sequenzierung von Positiv- Klonen erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben.

3.2.3 Klonierung der LTR- Enhancer Konstrukte

Für die Klonierung des 521 bp LTR- Promotor Fragments stromabwärts des Luziferase Gens in pGL3-Basic und pGL3-Var3_639 wurden beide Vektoren mit *SalI* geschnitten.

pGL3-Basic	pGL3-Var3_639
6,67 µl DNA (10 µg)	10 µl DNA (10 µg)
1 µl BSA	1 µl BSA
2 µl <i>SalI</i>	2 µl <i>SalI</i>
10 µl NEB 3	10 µl NEB 3
80,33 µl H ₂ O	77 µl H ₂ O
100 µl	100 µl

Inkubiert bei 37 °C über Nacht

Außerdem wurde das 521 bp LTR- Promotor Fragment durch *HindIII* und *XhoI* Verdau aus pGL3-LTR_521 isoliert.

30 µl pGL3-LTR_521
 15 µl NEB 2
 1,5 µl BSA (100x)
 3 µl *HindIII*
 3 µl *XhoI*
 97,5 µl H₂O

 150 µl inkubiert bei 37 °C über Nacht

Anschließend wurden alle Ansätze für 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert, dann gefällt und die Pellets in H₂O aufgenommen.

Es folgte ein Klenow- Verdau:

pGL3-Basic	pGL3-Var3_639	pGL3-LTR_521
2 µl DNA (1 µg)	1,6 µl DNA (1 µg)	4,23 µl DNA (5 µg)
0,4 µl Klenow (2 U)	0,4 µl Klenow (2 U)	2 µl Klenow (10 U)

pGL3-Basic	pGL3-Var3_639	pGL3-LTR_521
13,2 µl dNTPs (100 pmol/µl)	13,2 µl dNTPs (100 pmol/µl)	6,6 µl dNTPs (1 nmol/µl)
4 µl NEB 2	4 µl NEB 2	20 µl NEB 2
20,4 µl H ₂ O	20,8 µl H ₂ O	169,17 µl H ₂ O
40 µl	40 µl	200 µl

Dann wurden je Ansatz 2 µl (10 µl bei pGL3-LTR_521) 0,5 M EDTA zugegeben und bei 75 °C für 20 Minuten inaktiviert. Anschließend wurde gefällt und die Pellets in 17 µl H₂O resuspendiert.

Die Vektoren (pGL3-Basic und pGL3-Var3_639) wurden dephosphoryliert.

2 µl NEB 3
1 µl CIP (1 U)
17 µl Vektor- DNA

20 µl Inkubiert bei 37 °C für eine Stunde

Die dephosphorylierten Vektoren wurden mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

Der *Hind*III, *Xho*I geschnittene Vektor pGL3-LTR_521 wurde über ein Agarose Gel aufgetrennt. Die 521 bp Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Anschließend wurden alle Vektoren gefällt und die Pellets in je 5 µl H₂O resuspendiert.

Die Ligation von pGL3-Basic bzw. pGL3-Var3_639 mit dem 521 bp Promotor- Fragment wurde wie folgt durchgeführt.

0,5 µl Vektor (120 ng pGL3-Basic bzw. 130 ng pGL3-Var3_639)
3 µl Insert (500 ng 521 bp LTR- Promotor Fragment)
2 µl dATP (10 mM)
1 µl T4 Ligase
1 µl Ligase Puffer (10X)
2,5 µl H₂O

10 µl Inkubiert bei 15 °C über Nacht

Die Transformation erfolgte wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.3.1), das Screening jedoch erfolgte durch einen *Hind*III Verdau.

2 µl DNA (1 µg)
1,5 µl NEB 2
0,5 µl *Hind*III
11 µl H₂O

15 µl Inkubiert bei 37 °C für 2 Stunden

Die Restriktionsansätze wurden über ein Agarose Gel aufgetrennt und anhand der Fragmentgrößen konnte ermittelt werden, ob und in welcher Orientierung das Insert vorhanden ist.

3.2.4 Klonierung von pCDNA3-MCS

Für die Konstruktion von pCDNA3-MCS wurde der Ikaros Leserahmen aus pcDNA3-IK2 herausgeschnitten und der Vektor rezirkularisiert.

10 µl pCDNA3-IK2 (7 µg)
5 µl NEB 2
0,5 µl BSA (100x)
1 µl *Bam*HI
1 µl *Xho*I
32,5 µl H₂O

50 µl Inkubiert bei 37 °C für 4 Stunden

Anschließend wurde der Restriktionsansatz gefällt, und die DNA Klenow- verdaut.

1,2 µl DNA (550 ng)
2 µl NEB 2
6,6 µl dNTPs (100 pmol/µl)
0,2 µl Klenow (1 U)
10 µl H₂O

20 µl Inkubiert bei 25 °C für 15 Minuten

Das Enzym wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und Erhitzen auf 75 °C für 20 Minuten inaktiviert.

Anschließend wurde die DNA über ein Agarose Gel aufgetrennt, die Vektorbande ausgeschnitten, die DNA aus dem Gelblock isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit) und dann gefällt.

Um den Vektor zu rezirkularisieren wurde ligiert.

5 µl	Vektor
1 µl	Ligase Puffer (10x)
2 µl	dATP (10 mM)
1 µl	T4 Ligase
1 µl	H ₂ O

10 µl Inkubiert bei 15 °C für 4,75 Stunden

Anschließend wurde Transformiert und nach positiven Klonen durch *HindIII* Verdau gescreent.

1 µl	DNA
2 µl	NEB 2
1 µl	<i>HindIII</i>
16 µl	H ₂ O

20 µl Inkubiert bei 37 °C für 4 Stunden

Ein positiver Klon wurde ausgewählt und eingefroren.

3.3 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA oder cDNA wurden verschiedene PCRs durchgeführt. Dabei kamen unterschiedliche Polymerasen zum Einsatz. Sollten PCR- Fragmente für Klonierungen verwendet werden, so wurden „proofreading Polymerasen“ wie *PfuTurbo* und *PfuUltra* (Stratagene) eingesetzt. Für alle anderen Reaktionen wurden *Taq* Polymerase oder HotStarTaq Plus (beide Qiagen) verwendet. Bei *PfuUltra* und HotStarTaq Plus handelt es sich um sogenannte „Hotstart“ Polymerasen, d.h. das Enzym muss durch einen der PCR vorgeschalteten Schritt aktiviert werden. Dies geschieht durch mehrminütiges Erhitzen auf 95 °C. Da das Enzym vor diesem Schritt inaktiv ist, wird eine Elongation von Primer- Dimeren und unspezifisch gebundenen Primern während der ersten „Aufheizphase“ der PCR verhindert. Dies führt zu einer erhöhten Spezifität.

3.3.1 Amplifikation der Promotor- Inserts

Für die Amplifikation der Promotor- Inserts (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde wie folgt vorgegangen.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
5 µl Puffer (10x)	2 min 94 °C
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	
1 µl genomische DNA (150 ng)	30 sek 94 °C
0,5 µl Vorwärts- Primer (100 pmol/µl)	30 sek 62 °C - 35 Zyklen
0,5 µl Rückwärts- Primer (100 pmol/µl)	
1 µl <i>PfuTurbo</i>	50 sek 72 °C
36 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Die Kombination aus Vorwärts- und Rückwärts- Primer bestimmte die Art des Promotor- Inserts.

pGL3-LTR_521:	LTRProm-F	+	LTRProm-515R
pGL3-LTR-Neg:	LTRProm-F_Neg	+	LTRProm-515R_Neg
pGL3-LTR_162:	LTRProm-F	+	LTRProm-156R
pGL3-LTR_105:	LTRProm-F	+	LTRProm-99R
pGL3-Var3_639:	Var3Prom-633F	+	Var3Prom-R
pGL3-Var3-Neg:	Var3Prom-633F_Neg	+	Var3Prom-R_Neg
pGL3-Var3_253:	Var3Prom-247F	+	Var3Prom-R
pGL3-Var3_137:	Var3Prom-131F	+	Var3Prom-R

Zur Amplifikation des pGL3-LTR_552 Inserts waren andere Reaktionsbedingungen nötig.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
5 µl Puffer (10x)	2 min 95 °C
1 µl dNTPs (10 mM)	
1 µl genomische DNA (150 ng)	
0,5 µl LTRProm-F2 (100 pmol/µl)	30 sek 95 °C
0,5 µl LTRProm-515R (100 pmol/µl)	30 sek 60 °C - 35 Zyklen
1 µl <i>PfuUltra</i>	1 min 72 °C
41 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Die Amplifikation des pGL3-Var3_1644 Inserts scheiterte zunächst, da die im Vorwärts- Primer (pGL3-Var3_1644F) enthaltene *HindIII* Schnittstelle die Spezifität der PCR zu stark herabsetzte

und keine definierten Fragmente auftraten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die PCR zunächst mit einem Vorwärts- Primer ohne *HindIII* Schnittstelle durchgeführt.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
10 µl Puffer (10x)	2 min 95 °C
10 µl Betain	
2 µl dNTPs (10 mM)	
1 µl genomische DNA (150 ng)	30 sek 95 °C
0,5 µl Var3Prom-1644F_OS (100 pmol/µl)	30 sek 61 °C - 40 Zyklen
0,5 µl Var3Prom-R (100 pmol/µl)	
2 µl <i>PfuUltra</i>	2 min 72 °C
73 µl H ₂ O	

100 µl	10 min 72 °C

Anschließend wurde das PCR- Produkt über ein Gel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Dann wurde eine neue PCR, diesmal mit Var3Prom-1644F (mit *HindIII* Schnittstelle) durchgeführt.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
5 µl Puffer (10x)	2 min 95 °C
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	
1 µl DNA aus erster Amplifikation	30 sek 95 °C
0,5 µl Var3Prom-1644F (100 pmol/µl)	30 sek 55 °C - 35 Zyklen
0,5 µl Var3Prom-R (100 pmol/µl)	
1 µl <i>PfuUltra</i>	2 min 72 °C
36 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Das PCR- Produkt wurde dann für die Klonierung in pGL3-Basic eingesetzt.

3.3.2 Screening der Klone

Um zu überprüfen, ob die neu klonierten Luziferase- Vektoren tatsächlich das richtige Insert besitzen, wurden PCR Screenings durchgeführt. Vor der PCR wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie aufgenommen und die Bakterien im Reaktionsansatz resuspendiert.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
2 µl Betain	2 min 94 °C
2 µl Puffer (10x)	
0,4 µl dNTPs (10 mM)	
0,2 µl GLprimer2 (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C
0,2 µl RVprimer3 (100 pmol/µl)	30 sek 54 °C - 35 Zyklen
0,2 µl <i>Taq</i> Polymerase	50 sek 72 °C
15 µl H ₂ O	

20 µl + transformierte <i>E. coli</i> TOP10	10 min 72 °C

Das PCR- Produkt wurde auf ein Agarose Gel aufgetragen. Anhand der Fragmentgröße ließ sich abschätzen, ob ein Klon das gewünschte Insert enthielt. Diese wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

3.4 Synthese von cDNA

Für die cDNA Erststrangsynthese wurde AMV Reverse Transkriptase (Promega) verwendet. Es wurden parallel zwei Ansätze angefertigt. Einem dieser Ansätze wurde als Negativkontrolle keine Reverse Transkriptase zugegeben, um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA ausschließen zu können.

3 µg gesamt RNA oder 1 µg polyA⁺ RNA
 4 µl Oligo dT Primer (50 pmol/µl)
 ad H₂O 8,5 µl

Die Reaktion wurde für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt und dann sofort für weitere 5 Minuten auf Eis gestellt, um RNA Sekundärstrukturen aufzulösen. Dann wurde zugegeben:

4 µl 5 x AMV Puffer
 2,5 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl RNasin (40 U)
 2 µl Tetranatrium Pyrophosphat (40 mM); vorgewärmt auf 42 °C
 2 µl AMV Reverse Transkriptase

20 µl Inkubiert bei 42 °C für 60 Minuten

Anschließend wurde die Reaktion zur späteren Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

3.5 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit Hilfe des „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (ABI) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein „Cycle Sequencing“ Verfahren, welches darauf beruht, dass dem Sequenzierungsansatz beigemischte, fluoreszenzmarkierte Didesoxy- Nukleotide zu einem Abbruch der Verlängerung führen. Nach einigen Sequenzierungszyklen erhält man einen Pool unterschiedlich langer Fragmente, die an ihrem 3'-Ende ein markiertes Didesoxy- Nukleotid tragen. Da jede Didesoxy- Base mit einem anderen Fluorophor markiert ist, kann durch die Auftrennung der Fragmente nach Größe und gleichzeitiger Fluoreszenzmessung die Basenabfolge und damit die Sequenz ermittelt werden.

Entscheidend für die Qualität der Sequenzierung ist die Güte der DNA. Deshalb wurde als Matrize bevorzugt Plasmid DNA (isoliert mit „QIAprep Spin Miniprep Kit“, Qiagen) eingesetzt. Auch die direkte Sequenzierung von PCR Produkten wurde durchgeführt, jedoch wurde hier zuvor das PCR Produkt über ein Agarose Gel aufgetrennt, die Bande ausgeschnitten und mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Sequenziert wurde dann mit einem bereits für die PCR verwendeten Primer. Unter Umständen war es nötig, das PCR- Produkt mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) in den Vektor pCR 2.1-TOPO zu klonieren und die Sequenzierung dann nach erfolgter Plasmidisolierung mit den für diesen Vektor vorgesehenen Sequenzierprimern M13 Forward und M13 Reverse durchzuführen.

Generell wurde die Sequenzierungsreaktion wie folgt angesetzt:

x µl Matrize (10 ng bei PCR- Produkt- und 150 ng - 300 ng bei Plasmidsequenzierung)
 1 µl Sequenzierungsprimer (1,6 µM)
 2 µl BigDye Terminator v3.1
 ad H₂O 10 µl

PCR- Zyklen:

10 sek 96 °C

5 sek 50 °C - 25 Zyklen

4 min 60 °C

Zur Aufreinigung der Sequenzierprodukte wurden auf eine 96- Well Filterplatte (Millipore; Multiscreen-HV) je Well 300 µl Sephadex G-50 Superfine (in H₂O gequollen) pipettiert. Anschließend wurde bei 730 G für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Sequenzierreaktion auf die Sephadexmatrix aufgetragen und wiederum für zwei Minuten bei 730 G zentrifugiert. Der Durchfluss (ca. 8 µl) wurde aufgefangen und 1 Vol Formamid zugegeben. Die Probe wurde anschließend durch einen „ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) sequenziert.

Die Inserts aller der für diese Arbeit klonierten Vektoren wurden sequenziert. Hierfür wurden die Primer Glprimer2 und Rvprimer3 (alle Luziferase- Reporter- Konstrukte), sowie 1664Seq-F, 1644Seq-F2, 1664Seq-R, 1644Seq-R2 und 1644Seq-R3 (nur pGL3-Var3_1644) verwendet.

3.6 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA- Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Die Größe der aufzutrennenden Fragmente bestimmte dabei die Agarosekonzentration. Für Fragmentgrößen über 500 bp wurden 1,2 % Agarose, zwischen 200 bp und 500 bp wurden 1,5% Agarose und für kleinere Fragmente 2,0 % Agarose eingesetzt. Dementsprechend wurden 1,2 g, 1,5 g oder 2,0 g Agarose zusammen mit 100 ml 1x TBE Puffer in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und die Agarose durch Schwenken vollständig gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf etwa 70 °C abgekühlt und dann 10 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und gemischt. Ein Gelträger (11 cm x 12 cm) wurde mit einem Kamm versehen und an den Enden mit Klebeband abgedichtet. Nun wurde die Lösung auf den Gelträger gegossen und bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur stehen gelassen.

In der Zwischenzeit wurde den Proben 1/10 Vol Ladepuffer (10x) zugegeben. Nach Abkühlen des Gels wurden die Klebestreifen und der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1 x TBE Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Als Größenstandards wurden eine 50 bp Leiter und/oder eine 100 bp Leiter verwendet.

Die Proben wurden aufgetragen und der Lauf bei 100 V gestartet. Dabei war auf richtige Polung zu

achten (DNA ist negativ geladen und wandert von der Kathode zur Anode). Nachdem die Fragmente eine ausreichend große Strecke gelaufen waren (Bromphenolblau läuft bei etwa 200 bp), wurde das Gel entnommen und das Ergebnis auf einem UV- Leuchttisch begutachtet. Zur Dokumentation wurden Gelfotos mit einem Videoprinter ausgedruckt.

3.7 Kultivierung von Bakterien

Bakterien (*E. coli* TOP10) wurden ausschließlich in LB- Vollmedium kultiviert. Zur Anfertigung von Übernachtskulturen wurde LB- Flüssigmedium mit einer sterilen Impföse angeimpft und über Nacht bei 37 °C bei 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Enthielten die Bakterien ein Plasmid mit einem Resistenzgen, so wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Für die dauerhafte Aufbewahrung von Klonen wurden 500 µl Übernachtskultur mit 500 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

3.7.1 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP 10 (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*; Invitrogen) verwendet. Es wurden pro Ansatz 5 µl Plasmid-DNA und 25 µl Bakteriensuspension verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

3.8 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humane Zelllinien kultiviert.

3.8.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen

Gelagert wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Für die Kultivierung wurden die Zellen möglichst schnell aufgetaut. Hierfür wurde ein Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und sofort bei 37 °C in ein Wasserbad gestellt. Sobald das Medium vollständig aufgetaut war,

wurde das Röhrchen aus dem Wasserbad genommen und der Inhalt durch vorsichtiges Schütteln homogenisiert. Nun wurde die Zellsuspension auf eine auf 37 °C vorgewärmte 10 cm Gewebekulturschale (mit 10 ml Zellkulturmedium) pipettiert. Die Zellen wurden durch Schwenken gleichmäßig verteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Kultivierung der nicht adhärent wachsenden lymphoblastoiden Zelllinien wurden keine Gewebekulturschalen, sondern 25 cm² Gewebekulturflaschen (10 ml Medium) verwendet.

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop begutachtet, und spätestens nach zwei Tagen das Medium erneuert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und durch neues ersetzt. Die lymphoblastoiden Zellen wurden durch Zentrifugation (600 rpm; 5 min) pelletiert und dann in neuem Medium aufgenommen.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS (PAA Laboratories) gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 2 ml TrypLE Express (GIBCO) trypsiniert. Nach fünf Minuten im Inkubator (37 °C) hatten sich die Zellen von der Platte gelöst und die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt. Nun wurde die Zellsuspension zentrifugiert (600 rpm; 5 min) und das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Je 1 ml der Lösung wurden zusammen mit 10 ml Medium auf eine neue Platte pipettiert.

Lymphoblastoide Zellen wurden zentrifugiert (600 rpm; 5 min), das Pellet in 10 ml Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1 zu 10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Um Zellen einzufrieren, wurde zunächst wie bei einer normale Passage vorgegangen, d.h. erst wurde trypsiniert (nur adhärent wachsende Zellen) und anschließend zentrifugiert. Dann wurde das Pellet jedoch in 1 ml Cryo- safe Medium (ccpro) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde dann in einem Cryo- Einfriergerät (Nunc) bei -80 °C eingefroren. Dies gewährleistete eine konstante Temperaturabnahme von 1 °C pro Minute. Nach etwa einem Tag wurde das Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

3.8.2 Transfektion

Für die Transfektion von Zellen wurde „Effectene“ von der Firma Qiagen verwendet. Mit diesem Transfektionsreagenz kann eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen mit hoher Effizienz transfiziert werden. Die Durchführung der Transfektion richtete sich nach den Angaben des Herstellers, lediglich die „Effectene“- Konzentration wurde optimiert.

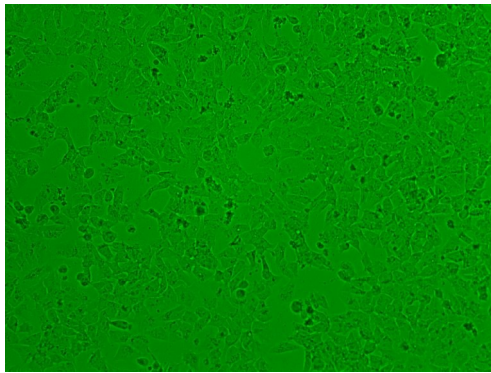
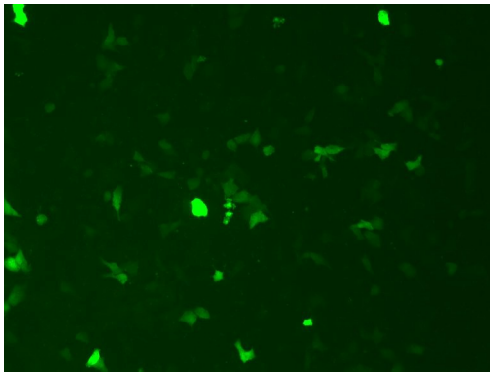
3.8.3 Ermitteln der Transfektionseffizienz bei NT2/D1 Zellen

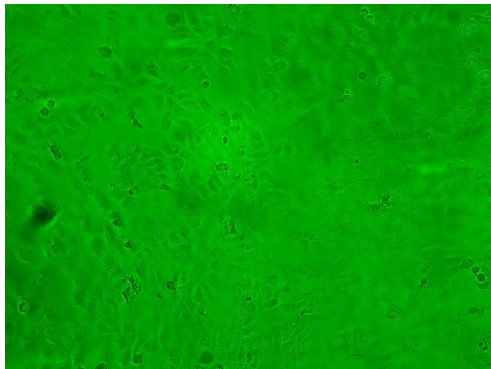
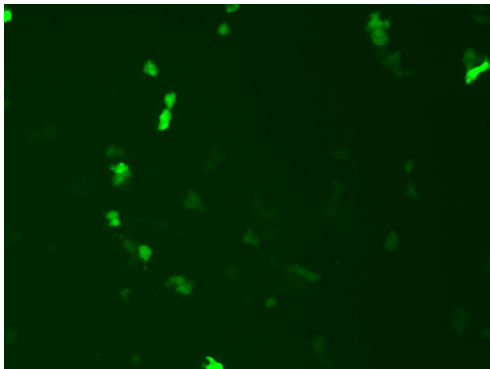
Die Transfektionseffizienz bei unterschiedlichen „Effectene“- Konzentrationen, aber gleicher DNA-Menge wurde bestimmt, um das optimale Verhältnis von hoher Transfektionseffizienz, guter Zellviabilität und geringem „Effectene“- Verbrauch zu ermitteln. Transfiziert wurde pEGFP, ein GFP exprimierender Vektor. So konnte die Transfektionseffizienz direkt durch Betrachten der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden. Pro Well einer 6- Well Zellkulturplatte wurden 1,5 µg pEGFP transfiziert.

Nachdem die Zellen (NT2/D1) eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurde jedes Well mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend 0,8 ml frisches und auf 37 °C vorgewärmtes Medium zugegeben. Dann wurde für jedes Well ein Transfektionsansatz mit unterschiedlicher „Effectene“- Konzentration pipettiert. Zuerst wurden 10 µl pEGFP (1,5 µg), 90 µl Puffer EC und 12 µl Enhancer zusammenpipettiert. Anschließend wurde kurz gemischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 37,5 µl, 31,25 µl, 25 µl, 18,75 µl, 12,5 µl oder 6,25 µl Effectene zugegeben und gemischt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden dem Transfektionsansatz 600 µl Medium zugegeben. Diese Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gebracht. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Tabelle 8 zeigt exemplarisch die Transfektionseffizienz und Zellviabilität bei einer „Effectene“- Zugabe von 37,5 µl und 6,25 µl.

Tabelle 8: Zellviabilität und Transfektionseffizienz bei NT2/D1 in Abhängigkeit von der Effectenekonzentration

<i>Effectene- zugabe</i>	<i>Viabilität</i>	<i>Transfektionseffizienz</i>
37,5 µl		

<i>Effectene- zugabe</i>	<i>Viabilität</i>	<i>Transfektionseffizienz</i>
6,25 µl		

Wie man sieht, ist die Transfektionseffizienz bei einer „Effectene“- Zugabe von 37,5 µl höher als bei 6,25 µl. Allerdings sind bei 37,5 µl viele Zellen abgestorben. Bei 6,25 µl war die Zellviabilität hoch und es wurden keine toten Zellen beobachtet. Die anderen „Effectene“- Mengen (31,25 µl, 25 µl, 18,75 µl, 12,5 µl; Daten nicht gezeigt) bestätigen den Trend, dass die Transfektionseffizienz mit höherer „Effectene“- Konzentration zunimmt, die Zellviabilität jedoch abnimmt.

Um in den Luziferase- Assays aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig vitale Zellen zu verwenden. Aus diesem Grund wurde für die Luziferase- Assays eine niedrige „Effectene“- Konzentration gewählt (6,75 µl). Die Transfektionseffizienz ist für diese Versuche ausreichend.

3.9 „Northern Blot“

Für den Nachweis des LTR- Transkriptes wurden Northern- Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurden ein „Human MTN Blot“ (Katalog Nr. 7760-1) und ein „Human Brain MTN Blot“ (Katalog Nr. 7793-1) der Firma Clontech verwendet. Als Sonden wurden einzelsträngige und mit dem radioaktiven Phosphorisotop ^{32}P endmarkierte DNA- Oligonukleotide oder random- markierte PCR Fragmente verwendet.

3.9.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide LTR-Northern und LTR-Northern2 wurden vor der Hybridisierung mit ^{32}P endmarkiert. Hierfür wurde wie folgt vorgegangen:

0,5 µl LTR-Northern(2) 50 pmol/µl
 5 µl 10x Puffer
 2,5 µl γ ³²P dATP (220 TBq/mmol; Hartmann Analytic, 38124 Braunschweig)
 5 µl T4 Polynukleotidkinase (3 U/µl; verdünnt aus 30 U/µl)
 37 µl H₂O

 50 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten, gefolgt von einem Inaktivierungsschritt (70 °C, 10 min). Anschließend wurde der Ansatz über eine MobiSpin G-50 Säule (MobiTec GmbH, 37083 Göttingen) aufgereinigt um die Nukleotide zu entfernen.

3.9.2 Herstellung und Markierung der β -Actin Sonde

Für die Normalisierung der Northern Blots wurde eine β - Actin Sonde hergestellt. Als Sonde wurde ein random- markiertes PCR Fragment verwendet. Für die Herstellung des Sondentemplates wurde wie folgt vorgegangen.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
2,5 µl cDNA (aus Human Placenta ges. RNA)	2 min 94 °C
10 µl Puffer (10x)	
1 µl dNTPs (10 mM)	
1 µl HBActin-F (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C
1 µl HBActin-R (100 pmol/µl)	30 sek 64 °C - 35 Zyklen
1 µl Taq Polymerase	1 min 72 °C
83,5 µl H ₂ O	

100 µl	10 min 72 °C

15 µl des PCR Produktes wurden auf ein Agarose Gel aufgetragen um zu bestätigen, dass durch die PCR ausschließlich das gewünschte Actin Fragment von 838 bp amplifiziert wurde. Anschließend wurde das PCR- Produkt mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt und die DNA Konzentration ermittelt. Das gereinigte PCR- Produkt wurde dann für die random- Markierung eingesetzt. Für die Markierung wurde das „Megaprime DNA Labelling System“ (Amersham) verwendet.

2,5 µl Sonden- Matrize (25 ng)
5 µl Random Primer Mix
18,5 µl H₂O

Anschließend wurde die DNA durch Erhitzen (5 min, 96 °C) denaturiert.

Nun wurden dem Ansatz zugegeben:

4 µl dGTP (aus dem Kit)
4 µl dATP (aus dem Kit)
4 µl dTTP (aus dem Kit)
5 µl α ³²P dCTP (110 TBq/mmol; Amersham Biosciences)
5 µl Puffer (10x)
2 µl Klenow Polymerase (aus dem Kit)

50 µl Inkubiert bei 37 °C für 10 Minuten

Anschließend wurden 5 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) zugegeben.

Die Sonde wurde über eine MobiSpin G-50 Säule (MobiTec GmbH, 37083 Göttingen) aufgereinigt.

3.9.2 Hybridisieren, Waschen und Exposition

Der Blot wurde zur Prähybridisierung in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt (mit der RNA Seite nach innen) und 20 ml Northern (Prä)hybridisierungspuffer (siehe 2.2) zugegeben. Es wurde für vier Stunden bei 40 °C unter Rotation prähybridisiert.

Anschließend wurde der (Prä)hybridisierungspuffer ersetzt, die Sonde denaturiert (95 °C, 2 Minuten) und in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 40 °C für eine Stunde unter Rotation. Zum Waschen wurde das Hybridisierungsgemisch abgegossen und 20 ml 6 x SSC 0,1 % SDS (21°C) zugegeben und kurz geschwenkt. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und 20 ml 2 x SSC 0,1 % SDS (40 °C) zugegeben und bei 40 °C unter Rotation im Hybridisierungsofen inkubiert. Der Puffer wurde entfernt und der Blot aus dem Röhrchen genommen und die Radioaktivität gemessen. Lag der Wert bei über 200 cps, so wurde der letzte Waschschrift so lange wiederholt, bis ein Wert von etwa 200 cps gemessen wurde.

Dann wurde der Blot mit der RNA- Seite nach unten auf einen Röntgen- Film (Kodak Biomax MR) gelegt und bei -80 °C exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.10 Bestimmung der Luziferaseaktivität der unterschiedlichen Promotor-Konstrukte

Zur Bestimmung der Promotoraktivität wurde die Luziferaseaktivität von Lysaten Luziferase-Reporter- Vektor transfizierter Zellen gemessen. Die Zelllinien NT2/D1 und U87 wurden mit den Reporter- Konstrukten, sowie einem *Renilla* Luziferase exprimierenden Vektor (zur Normalisierung) kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität mit Hilfe des „Dual- Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) bestimmt. Die Versuchsdurchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Alle Versuche wurden im 6- Well Maßstab durchgeführt. Für jedes Konstrukt wurden drei voneinander unabhängige Parallelexperimente durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurde zwölf Stunden nach der Transfektion das Medium erneuert. Nach weiteren 36 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 250 µl „Passive Lysis“- Puffer (aus dem Kit) zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines „Zellschabers“ vom Untergrund gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren. Dann wurden die Lösungen zur vollständigen Lyse aufgetaut, kurz gemischt und wieder eingefroren.

Zur Messung der Aktivität der Firefly Luziferase wurden 10 µl Lysat mit 50 µl Luziferase Assay Reagent II (aus dem Kit) gemischt und sofort im Luminometer gemessen. Nach einer Messzeit von 10 Sekunden wurden vom Gerät automatisch 50 µl Stop & Glo Reagent zupipettiert. Dies führt zu einem „quenching“ der Firefly Luziferase und gleichzeitig zur Aktivierung der *Renilla* Luziferase. Die Messzeit betrug auch hier 10 Sekunden.

3.10.1 Luziferaseaktivität der Variante 3 Promotor- Konstrukte

Die Luziferaseaktivität der Vektoren pGL3-Var3_639, pGL3-Var3_253, pGL3-Var3_137 und pGL3-Var3-Neg wurde für die Zelllinien NT2/D1 und U87 bestimmt. Als Referenz wurde die Aktivität des promotorlosen Vektors pGL3-Basic ermittelt. Zusätzlich wurde als Vergleich der Vektor pGL3-Promotor (mit SV40 Promotor) mitgemessen.

Transfektion pro Well:

750 ng	Luziferase- Reporter- Konstrukt (5 µl)
250 ng	Renilla Vektor (2,5 µl)
92,5 µl	Puffer EC (aus Effectene Transfection Reagent- Kit; Qiagen)

6,5 µl	Enhancer
6,75 µl	Effectene
800 µl	Medium

3.10.1.1 Induktion von HIF-1 α

Hier wurde die Luziferaseaktivität der Vektoren pGL3-Basic, pGL3-Var3_1644, pGL3-Var3_639, pGL3-Var3_639-TS und des Hypoxie- Reporter- Plasmids [106] in der Zelllinie U87 ermittelt. Es wurden zwei Versuche parallel durchgeführt. Bei einem dieser Versuche wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion in eine Hypoxiekammer (1 % O₂, 5 % CO₂) gestellt und dort bis zur Lyse (nach weiteren 24 h) inkubiert.

Folgender Transfektionsansatz wurde verwendet. Die Mengen beziehen sich auf ein Well.

750 ng	Luziferase- Reporter- Konstrukt (5 µl) oder 250 ng Hypoxie- Reporter- Plasmid (5 µl)
250 ng	Renilla Vektor (2,5 µl)
92,5 µl	Puffer EC (aus Effectene Transfection Reagent- Kit; Qiagen)
6,5 µl	Enhancer
6,75 µl	Effectene
800 µl	Medium

3.10.1.2 Koexpression von Ikaros Isoform 2 und 8

Hier wurde die Luziferaseaktivität der Vektoren pGL3-Basic, pGL3-Var3_1644 und pGL3-Var3_639 in NT2/D1 und U87 ermittelt. Zusätzlich zu dem für die Normalisierung notwendigen *Renilla* Vektor wurden die Expressionsvektoren pCDNA3-IK2, pCDNA3-IK8 oder pCDNA3-MCS kotransfiziert.

Es wurde folgender Transformationsansatz verwendet:

500 ng	Luziferase- Reporter- Konstrukt (3,33 µl)
500 ng	pCDNA3 Expressionsvektor (3,33 µl)
50 ng	Renilla Vektor (0,5 µl)
97,8 µl	Puffer EC (aus Effectene Transfection Reagent- Kit; Qiagen)
6,5 µl	Enhancer
6,75 µl	Effectene
800 µl	Medium

3.10.1.3 Koexpression von MEF2C

Die Luziferaseaktivität der Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Var3_1644 bei Koexpression von pMEF2C-1.6 oder pMT2 wurde in der Zelllinie U87 ermittelt.

Es wurde folgender Transformationsansatz verwendet:

500 ng	pGL3-Basic oder pGL3-Var3_1644 (3,33 µl)
500 ng	pMEF2C-1.6 oder pMT2 (3,33 µl)
50 ng	Renilla Vektor (0,5 µl)
97,8 µl	Puffer EC (aus Effectene Transfection Reagent- Kit; Qiagen)
6,5 µl	Enhancer
6,75 µl	Effectene
800 µl	Medium

3.10.2 Luziferaseaktivität der LTR Promotor- Konstrukte

In diesem Versuch wurde die Luziferaseaktivität der Reporter- Konstrukte mit einem LTR-Promotor Insert ermittelt. Es wurden die Vektoren pGL3-Basic, pGL3-Promotor, pGL3-LTR_521, pGL3-LTR_162, pGL3-LTR_105 und pGL3-LTR_521-Neg verwendet. Auch hier wurde zur Normalisierung der *Renilla* Luziferase Vektor kotransfiziert.

Es wurde folgender Transformationsansatz verwendet:

750 ng	Luziferase- Reporter- Konstrukt (5 µl)
250 ng	Renilla Vektor (2,5 µl)
92,5 µl	Puffer EC (aus Effectene Transfection Reagent- Kit; Qiagen)
6,5 µl	Enhancer
6,75 µl	Effectene
800 µl	Medium

3.10.3 Luziferaseaktivität der LTR Enhancer- Konstrukte

Die Messung der Luziferaseaktivität der LTR Enhancer- Konstrukte geschah analog zu den bereits beschriebenen Versuchen. Es wurden die Vektoren pGL3-Basic, pGL3-Basic_LTRenh_s, pGL3-Basic_LTRenh_as, pGL3-Var3_639, pGL3-Var3_639_LTRenh_s und pGL3-Var3_639_LTRenh_as zusammen mit dem *Renilla* Luziferase Vektor kotransfiziert. Das Transfektions- Schema entspricht dem von Punkt 3.12.2.

3.11 „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)

Zur Identifikation von Transkriptionsstartpunkten (5'- RACE) wurde der „BD SMART RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma BD Biosciences verwendet. Zuerst wurde sogenannte „5'- RACE- Ready cDNA“ nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Bei dieser Methode wird direkt bei der Erststrangsynthese ein Oligonukleotid (BD SMART II A Oligonucleotide) mit spezifischer Sequenz an das 3'- Ende der cDNA (entspricht dem 5'- Ende der RNA) gekoppelt. Bei den anschließenden PCR- Amplifikationen macht man sich dies zunutze, indem man einen genspezifischen und einen zum BD SMART II A Oligonukleotid komplementären Primer wählt. Da nur ein genspezifischer Primer verwendet werden kann, ist die Spezifität im Vergleich zu einer PCR mit zwei genspezifischen Primern herabgesetzt. Aus diesem Grund wurde das PCR- Produkt als Matrize für eine weitere PCR mit „Nested“ Primern eingesetzt.

Die in der zweiten (nested) PCR amplifizierten Fragmente wurden über ein Agarose Gel aufgetrennt, die Bande(n) ausgeschnitten und die DNA isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen).

3.11.1 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Transkriptvariante 3

Als Ausgangsmaterial für die Synthese der „5'- RACE- Ready cDNA“ wurde 1 µg poly A⁺ RNA (mRNA) aus Nucleus Caudatus (Clontech, Best. Nr. 636132) verwendet.

Die erste Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
2,5 µl 5'- RACE- Ready cDNA	2 min 94 °C
5 µl Puffer (10x)	
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	30 sek 94 °C
1 µl Ex2V3-R5 (100 pmol/µl)	30 sek 63 °C - 35 Zyklen
5 µl Universal Primer Mix (aus SMART RACE Kit)	
1 µl Taq Polymerase (Qiagen)	3 min 72 °C
29,5 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Anschließend wurde das PCR Produkt mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen)

gereinigt und 1 µl als Matrize in der Nested- PCR eingesetzt.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
1 µl gereinigtes PCR- Produkt	2 min 94 °C
5 µl Puffer (10x)	
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	30 sek 94 °C
1 µl Ex2V3-R2 (100 pmol/µl)	30 sek 60 °C - 35 Zyklen
1 µl Nested Universal Primer (aus SMART RACE Kit)	
1 µl <i>Taq</i> Polymerase (Qiagen)	3 min 72 °C
35 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Das PCR- Produkt wurde auf ein Agarose Gel aufgetragen und anschließend die Banden ausgeschnitten. Die DNA wurde isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) und anschließend mit dem Primer Ex2V3-R2 sequenziert.

3.11.2 Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes durch PCR

Um zu überprüfen, ob es noch weiter proximal gelegene Transkriptionsstartpunkte gibt, die mit RACE nicht zu erfassen gewesen wären, wurden Amplifikationen mit zwei genspezifischen Primern durchgeführt. Es wurden zwei Primerkombinationen verwendet. Bei der einen befindet sich der Forward- Primer (Ex2V3-F4) direkt vor (5') dem am meisten proximal gelegenen Transkriptionsstartpunkt. Bei der anderen Primerkombination befindet sich der Primer (Ex2V3-F3) direkt hinter dem Transkriptionsstart.

Es wurde DNase- verdaute gesamt RNA aus der Zelllinie NT2/D1 in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde ein identischer Ansatz, jedoch ohne Reverse Transkriptase angefertigt.

Als Matrize für die PCR wurden entweder cDNA, der Ansatz ohne Reverse Transkriptase, oder 85 ng genomische DNA eingesetzt.

<i>Reaktionsansätze</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
5 µl cDNA, Ansatz ohne Rev. Transkr. oder genom. DNA	2 min 94 °C
5 µl Puffer (10x)	
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	30 sek 94 °C
0,5 µl Ex2V3-F3 oder Ex2V3-F4 (100 pmol/µl)	30 sek 60 °C - 35 Zyklen
0,5 µl Ex2V3-R2 (100 pmol/µl)	
1 µl <i>Taq</i> Polymerase (Qiagen)	45 sek 72 °C
32 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Anschließend wurden die PCR- Produkte über ein Agarose Gel aufgetrennt. Das PCR Produkt der cDNA- Amplifikation mit den Primern Ex2V3-F3 und Ex2V3-R2 wurde gereinigt und anschließend Sequenziert (Primer Ex2V2-R2). (Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem PCR Produkt um das gewünschte Fragment aus dem Promotorbereich von Transkriptvariante 3 handelte.)

3.11.3 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes des LTR- Promotors

Für die Identifikation des Transkriptionsstartpunktes wurden zunächst NT2/D1 Zellen mit dem Vektor pGL3-LTR_552 transfiziert.

Für eine Transfektion wurden angesetzt (10 cm Zellkulturplatte):

17,5 µl	pGL3-LTR_552 (6 µg)
382,5 µl	Puffer EC
48 µl	Enhancer
50 µl	Effectene
4,5 ml	Medium

Zwölf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, dann zentrifugiert und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde die gesamte RNA isoliert (mit DNase Verdau) und daraus „5'- RACE- Ready cDNA“ synthetisiert (mit Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase).

Die erste Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
2,5 µl 5'- RACE- Ready cDNA oder Negativkontrolle	5 min 95 °C
5 µl Puffer (10x)	
1 µl dNTPs (10 mM)	
0,5 µl Luc-R (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C - 5 Zyklen
5 µl Universal Primer Mix (aus SMART RACE Kit)	1 min 72 °C
1 µl HotStarTaq Plus (Qiagen)	
35 µl H ₂ O	30 sek 94 °C
-----	30 sek 70 °C - 5 Zyklen
50 µl	1 min 72 °C
	30 sek 94 °C
	30 sek 68 °C - 35 Zyklen
	1 min 72 °C

Anschließend wurde eine Nested- PCR wie folgt durchgeführt.

Reaktionsansatz	PCR- Zyklen
1 µl gereinigtes PCR- Produkt	5 min 95 °C
5 µl Puffer (10x)	
1 µl dNTPs (10 mM)	
0,5 µl GLprimer2 (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C
0,5 µl Nested Universal Primer (aus SMART RACE Kit)	30 sek 56 °C - 35 Zyklen
1 µl HotStarTaq Plus (Qiagen)	30 sek 72 °C
41 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Ein Teil der PCR Produkte wurde über ein Agarose Gel aufgetrennt, die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA isoliert.

Nun wurde die DNA (gereinigtes PCR Produkt oder aus Gel isoliert) mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) in den Vektor pCR 2.1-TOPO ligiert und *E. coli* TOP10 durch den Ligationsansatz transformiert. Die Klone wurden vereinzelt und Übernachtskulturen angefertigt. Nach erfolgter Plasmidisolierung wurden die Vektor- Inserts (also die RACE- Produkte) sequenziert (Sequenzierprimer M13 Forward und M13 Reverse).

Um die Transkriptionsstartpunkte in vivo zu bestätigen, wurde die 5'- RACE wiederholt. Diesmal wurde der Transkriptionsstart anhand genomischer LTR Transkripte ermittelt. Für die „5'- RACE-

Ready cDNA“ Synthese wurden 1 µg Human Fetal Brain poly A+ RNA (Clontech, Best. Nr. 636106) eingesetzt.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
5 µl 5' - RACE- Ready cDNA oder Negativkontrolle	2 min 95 °C
5 µl Puffer (10x)	
1 µl dNTPs (10 mM)	
0,2 µl LTR12-F4 (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C - 5 Zyklen
5 µl Universal Primer Mix (aus SMART RACE Kit)	45 sek 72 °C
1 µl <i>PfuUltra</i>	
32,8 µl H ₂ O	30 sek 94 °C
-----	30 sek 70 °C - 5 Zyklen
50 µl	30 sek 72 °C
	30 sek 94 °C
	30 sek 68 °C - 40 Zyklen
	30 sek 72 °C

Die Nested- PCR wurde wie folgt durchgeführt.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
0,5 µl gereinigtes PCR- Produkt	2 min 95 °C
5 µl Puffer (10x)	
1 µl dNTPs (10 mM)	
0,5 µl LTR12-F5 (100 pmol/µl)	30 sek 94 °C
0,5 µl Nested Universal Primer (aus SMART RACE Kit)	30 sek 60 °C - 35 Zyklen
0,5 µl <i>PfuUltra</i>	30 sek 72 °C
42 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Ein Teil des PCR Produktes wurde auf ein Agarose Gel aufgetragen. Die 210 bp Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Anschließend wurde die DNA in den Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO kloniert. Dann wurden die Vektor- Inserts sequenziert.

3.12 Test auf Spleiß- Alterationen im Bereich *TAF1* Exon 18-19

Mit Hilfe von PCR wurde versucht, mögliche Spleiß- Varianten im Bereich *TAF1* Exon 18-19 zu identifizieren. Es wurde cDNA aus verschiedenen RNA- Spezies synthetisiert. Eingesetzt wurden 3 µg gesamt RNA oder 1 µ poly A⁺ RNA. Die cDNA- Synthese erfolgte wie unter Punkt 3.5 beschrieben.

Für die cDNA- Synthese wurde RNA aus sechs unterschiedlichen Zelllinien und Geweben eingesetzt:

Lymphoblastoide Zelllinie Kontrolle 1 (WT): gesamt RNA
 Lymphoblastoide Zelllinie Kontrolle 2 (WT): gesamt RNA
 Lymphoblastoide Zelllinie Patient 1 (XDP): gesamt RNA
 Lymphoblastoide Zelllinie Patient 2 (XDP): gesamt RNA
 Human Fetal Brain (Clontech, Best. Nr. 636106): poly A⁺ RNA
 Skeletal Muscle (Clontech, Best. Nr. 636534): gesamt RNA

Für die Amplifikation des Bereichs um Exon 18-19 wurde folgende PCR durchgeführt.

<i>Reaktionsansatz</i>	<i>PCR- Zyklen</i>
2 µl cDNA	2 min 94 °C
5 µl Puffer (10x)	
5 µl Betain	
1 µl dNTPs (10 mM)	20 sek 94 °C
0,5 µl TAF_EX_18-F (100 pmol/µl)	30 sek 56 °C - 45 Zyklen
0,5 µl TAF_EX_19-R (100 pmol/µl)	
1 µl <i>Taq</i> Polymerase (Qiagen)	1 min 72 °C
35 µl H ₂ O	

50 µl	10 min 72 °C

Die PCR- Produkte wurden anschließend auf ein Agarose Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

Diese Arbeit befasst sich mit dem beim Dystonie- Parkinson- Syndrom mutierten Transkriptsystem *DYT3/TAF1* und gliedert sich in zwei Schwerpunkte.

Der erste Teil der Arbeit umfasst Untersuchungen zur von Nolte *et al.* [54] beschriebenen *DYT3* Transkriptvariante 3. Es sollte überprüft werden, ob es sich um ein *TAF1* unabhängiges Transkript handelt. Hierfür wurde der Transkriptionsstartpunkt ermittelt. Zusätzlich wurden Promotor-Analysen durchgeführt und putative Transkriptionsfaktor- Bindestellen ermittelt. Anschließend wurde für die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α , MEF-2 und Ikaros überprüft, ob diese die Aktivität des Promotors beeinflussen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Identifizierung und Charakterisierung eines in Exon 4 des *DYT3/TAF1* Transkriptsystems lokalisierten Gegenstrangtranskripts. Es wurde überprüft, ob ein distal von Exon 4 gelegenes LTR Element Promotor- sowie Enhanceraktivität besitzt. Es sollte die Promotoraktivität des LTR gezeigt, sowie das dazugehörige Transkript nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der Transkriptionsstartpunkt ermittelt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob ein XDP spezifischer SNP in *TAF1* Intron 18-19 zu Spleiß- Veränderungen führen könnte.

4.1 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Transkriptvariante 3

Es sollte überprüft werden, ob es sich bei der von Nolte *et al.* [54] beschriebenen Transkriptvariante 3 um ein *TAF1*- Exon unabhängiges Transkript handelt. Hierfür wurde der Transkriptionsstartpunkt ermittelt.

4.1.1 5'- RACE zur Identifikation des Transkriptionsstartpunktes

Zur Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Transkriptvariante 3 wurden 5'- RACE (Rapid Identification of cDNA Ends) Experimente durchgeführt. Bei dieser Methode wird zuerst mRNA in cDNA umgeschrieben. An das 3'- Ende der cDNA wird eine „Linker“- Sequenz angehängt. Anschließend wird das Target mit Hilfe von PCR unter Verwendung eines genspezifischen und eines zur Linker- Sequenz komplementären Primers amplifiziert. Das PCR-Produkt kann anschließend sequenziert werden.

Die „Linker“- Sequenz kann im Anschluss an die cDNA Synthese mit Hilfe einer Terminalen Transferase angehängt werden. Dieser Reaktionsschritt verläuft allerdings recht ineffizient. Außerdem erhält man hierbei keinen spezifischen Linker, sondern für gewöhnlich einen 3' poly A Schwanz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkriptionsstartpunkte mit Hilfe des „BD SMART RACE cDNA Amplification Kit“ (BD Biosciences) ermittelt. Dem Kit liegt ein von Zhu *et al.* [109] verbessertes RACE- Verfahren zugrunde, die sogenannte „SMART RACE“ (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript). Hier wird eine spezifische „Linker“- Sequenz („BD SMART II A“ Oligonukleotid) direkt während der cDNA Synthese an das 3'- Ende der cDNA angehängt. Dies erhöht die Spezifität für die folgenden PCR- Amplifikationen. Die Abbildung 6 veranschaulicht das Prinzip dieser Methode.

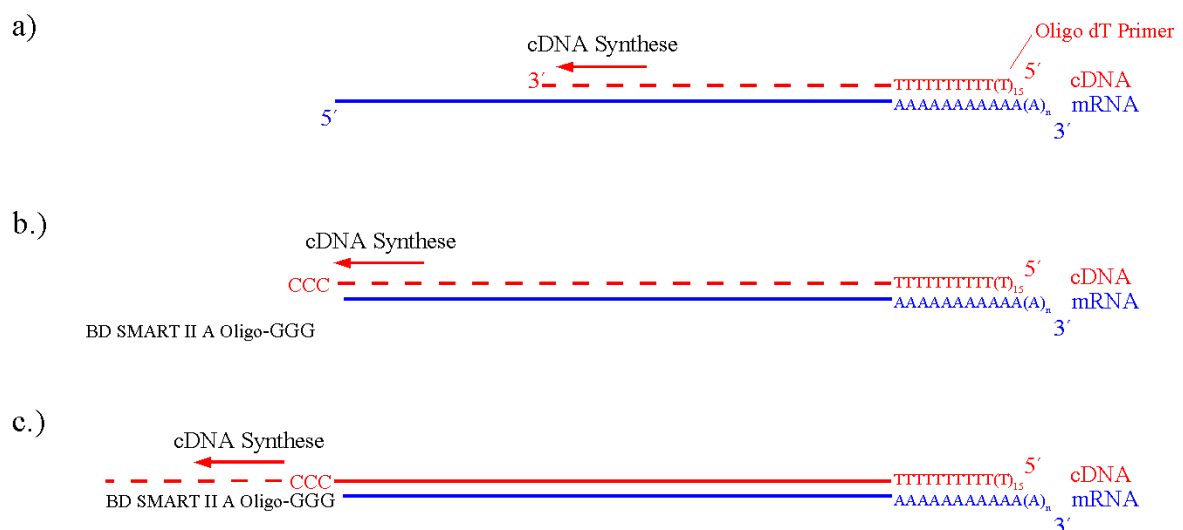


Abb. 6: Prinzip der „SMART RACE“. (a) Die oligo dT hybridisierte mRNA wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. (b) Erreicht die Verlängerung das 5'- Ende der mRNA, so werden durch die Terminale Transferase- Aktivität der Reversen Transkriptase mehrere Nukleotide (vorzugsweise C) an das 3'- Ende der cDNA angehängt. An diesen Überhang kann das „BD SMART II A“ Oligonukleotid anlagern und dient im weiteren (c) als Matrize für das Fortschreiten der cDNA Synthese.

Die nach der oben beschriebenen Methode hergestellte cDNA wurde als Matrize in einer PCR eingesetzt. Es wurden ein Universalprimer (UP) und der Primer Ex2V3-R5 (Abb. 7) verwendet.

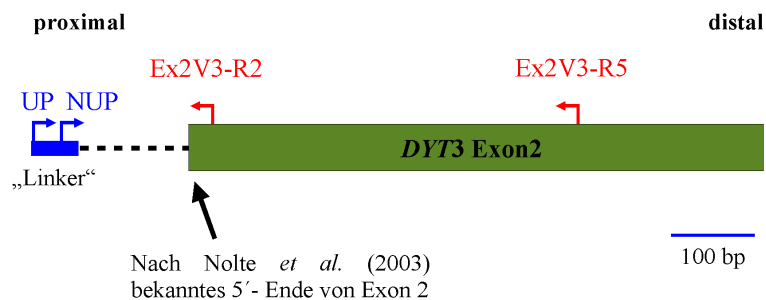


Abb. 7: Bindestellen der für die RACE- PCR eingesetzten Primer. Dargestellt sind die genspezifischen Primer Ex2V3-R2 und Ex2V3-R5, sowie der Universalprimer (UP) und der Nested Universalprimer (NUP).

Das PCR- Produkt wurde anschließend auf einem Agarose- Gel aufgetrennt. Die folgende Abbildung (Abb. 8) zeigt das dazugehörige Gelfoto.

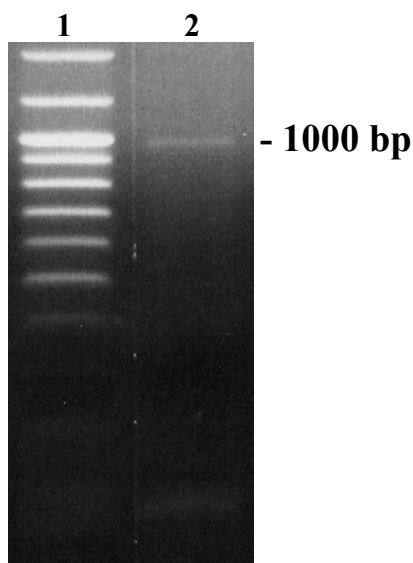


Abb. 8: Ergebnis der Amplifikation mit Ex2V3-R5 und Universalprimer. In Spur 1 wurde eine 100 bp Leiter („Forever 100 bp Ladder Personalizer“; Seegene) aufgetragen. Spur 2 zeigt das PCR Amplifikat.

Die Abbildung 8 zeigt eine schwache Bande bei etwa 1000 bp. Es könnte sich hierbei um eine 5'-Verlängerung von Exon 2 oder aber um ein anderes, unspezifisches RACE- Produkt handeln.

Die PCR Amplifikat wurde gereinigt und als Matrize für eine Nested- PCR eingesetzt. Als Primer wurden der Exon 2 spezifische Primer Ex2V3-R2 und der Nested Universalprimer verwendet (Abb. 7). Das PCR- Produkt wurde auf ein Agarose- Gel aufgetragen und das Gel anschließend photographiert.

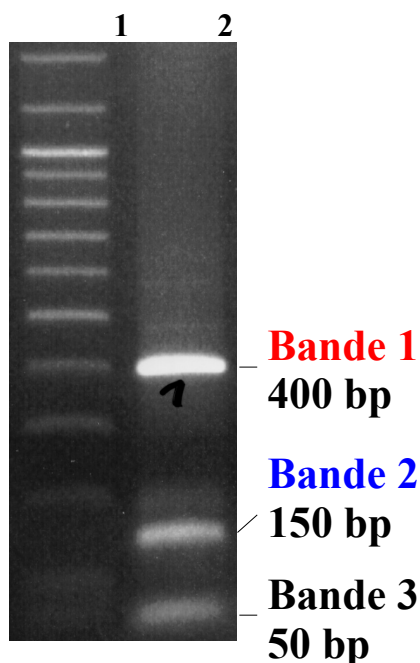


Abb. 9: Ergebnis der Amplifikation mit Ex2V3-R2 und Nested Universalprimer. In Spur 1 wurde eine 100 bp Leiter („Forever 100 bp Ladder Personalizer“; Seegene) aufgetragen. Spur 2 zeigt das Amplifikat der Nested PCR.

Berücksichtigt man den Abstand von Primer Ex2V3-R5 und Ex2V3-R2 (436 bp), so würde man ausgehend von der 1000 bp Bande in Abbildung 8 in der darauf folgenden Nested- PCR eine Bande bei etwa 600 bp erwarten. Auf dem Gel (Abb. 9) waren jedoch zwei Banden bei 400 bp (1) und bei 150 bp (2), sowie eine Dimerbande (3) bei etwa 50 bp zu erkennen. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der 1000 bp Bande aus Abbildung 8 um eine 5' Verlängerung von Exon 2 handelt. Trotzdem war die erste PCR (Abb. 8) notwendig, da lediglich mittels Nested- PCR die für diesen Versuch notwendige Spezifität erreicht werden konnte.

Die Banden (1,2; Abb. 9) wurden ausgeschnitten, die DNA extrahiert und anschließend sequenziert.

INR +1 (Konsensussequenz: PyPyA_nN(T/A)PyPy)

GGCCTCTAACAACATCTCTTTAAAAATATACATTTTACACTTCCTGCACCTCAGCAAAGGTGGCAATGTAATCAACACACTGGCTTA
 NNNNTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGACACTTCCTGCACCTCAGCAAAGGTGGCAATGTAATCAACACACTGGCTTA
 BD SMART IIA Oligo

TTTGTCTCTCCTCACTATTAGACGCATGTCCCCAACTACCTGTTATAAGCCCTGTTTTTTTT-CTGGACTTCTCAAGGGCTTTGC
 TTTGTCTCTCCTCACTATTAGACGCATGTCCCCAACTACCTGTTATAAGCCCTGTTTTTTTTCTGGACTTCTCAAGGGCTTTGC

CCATCGTTCTTTCCCGGCATCTGGAACAGTACCACTTGCGCTTTGGTTTATGGTTGAGACTCACACACGAGAAGCGGAACCACTC
 CCATCGTTCTTTCCCGGCATCTGGAACAGTACCACTTGCGCTTTGGTTTATGGTTGAGACTCACACACGAGAAGCGGAACCACTC

GATGGGGCATTTCGTTGTGCGAGCGGATCATCTCCAGTAGGAGGGCTCGCTGGGGTCGATGGGGAGGTCTGCGGGGACGCCTGCC
 GATGGGGCATTTCGTTGTGCGAGCGGATCATCTCCAGTAGGAGGGCTCGCTGGGGTCGATGGGGAGGTCTGCGGGGACGCCTGCC
 NTTNAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGAGTAGGAGGGCTCGCTGGGGTCGATGGGGAGGTCTGCGGGGACGCCTGCC
 BD SMART IIA Oligo

GCTACGCCTTGGCCATGGAGCTCTGCTTCTTTAGAGGTCTGGGCTTCTTCTCCTTGGGC
 GCTACGCCTTGGCCATGGAGCTCTGCTTCTTTAGAGGTCTGGGCTTCTTCTCCTTGGGC Ex2V3-R2
 GCTACGCCTTGGCCATGGAGCTCTGCTTCTTTAGAGGTCTGGGCTTCTTCTCCTTGGGC

Abb. 10: Sequenzierung der 5' RACE Produkte. Dargestellt sind die Ergebnisse der Sequenzierung von Bande 1 (rot) und Bande 2 (blau). Die genomische Sequenz ist schwarz dargestellt. Der Sequenzierprimer (Ex2V3-R2) ist unterstrichen und das nach [54] bekannte 5'- Ende von Exon 2 ist fett gedruckt. Die Sequenzierung von Bande 1 (rot) ergab einen Transkriptionsstartpunkt an einem „initiator element“ (INR; unterstrichen).

Die Sequenzierung (Abb. 10) zeigte, dass es sich bei beiden Banden um Exon 2 Verlängerungen handelte.

Exon 2 konnte um 312 bp in 5'- Richtung verlängert werden. Es wurden zwei Transkriptionsstartpunkte ermittelt. Der durch die Sequenzierung von Bande 1 (Abb. 9) ermittelte Transkriptionsstartpunkt befindet sich exakt an einem INR Element (PyPyA₊₁N(T/A)PyPy).

4.1.2 Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes

Es wurde überprüft, ob die 5'- Verlängerungen von Exon 2 um 312 bp tatsächlich die größtmögliche Verlängerung darstellt, oder ob es noch weitergehende 5'- Verlängerungen gibt, die durch die RACE nicht erfasst wurden. Hierfür wurden PCR Amplifikationen mit je zwei transkript-spezifischen Primern (Abb. 11) durchgeführt.

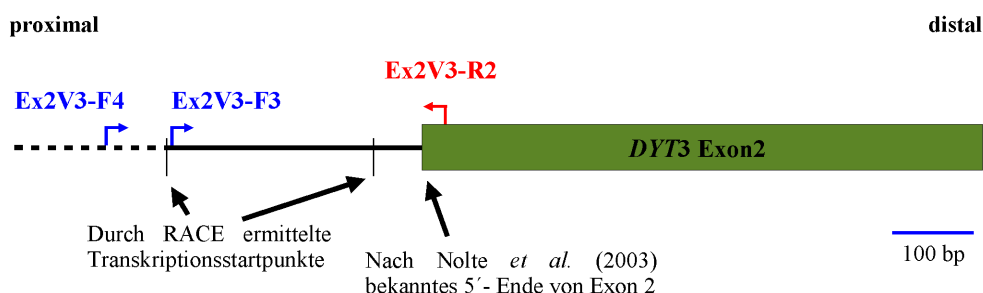


Abb. 11: Darstellung der für die Überprüfung des Transkriptionsstartpunktes verwendeten Primer. Die Vorwärts- Primer sind blau und der Rückwärtsprimer rot darstellt. Ex2V3-F3 befindet sich gerade noch in der größten, durch die RACE Experimente ermittelten Exon 2- Verlängerung. Ex2V3-F4 befindet sich proximal davon, und damit nicht mehr im Transkript-Bereich.

Die Vorwärts- Primer wurden so gewählt, dass sich ein Primer (Ex2V3-F3) gerade noch im Transkriptbereich, und der andere Primer (Ex2V3-F4) knapp außerhalb davon befindet. Bei der Amplifikation von cDNA sollte bei der Primerkombination Ex2V3-F3 und Ex2V3-R2 ein Produkt von 370 bp amplifiziert werden.

Sollte es noch weitergehendere 5'- Verlängerungen von Exon 2 als die bisher identifizierten geben, so würde man bei der Primerkombination Ex2V3-F4 und Ex2V3-R2 ein PCR- Produkt von 477 bp erhalten, andernfalls nicht. Neben cDNA wurden als Kontrolle genomische DNA, sowie ein cDNA-Ansatz, dem keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde als Matrize eingesetzt. Dies sollte gewährleisten, dass die Funktionsfähigkeit der Primer überprüft werden konnte und die cDNA nicht

durch genomische DNA verunreinigt war.

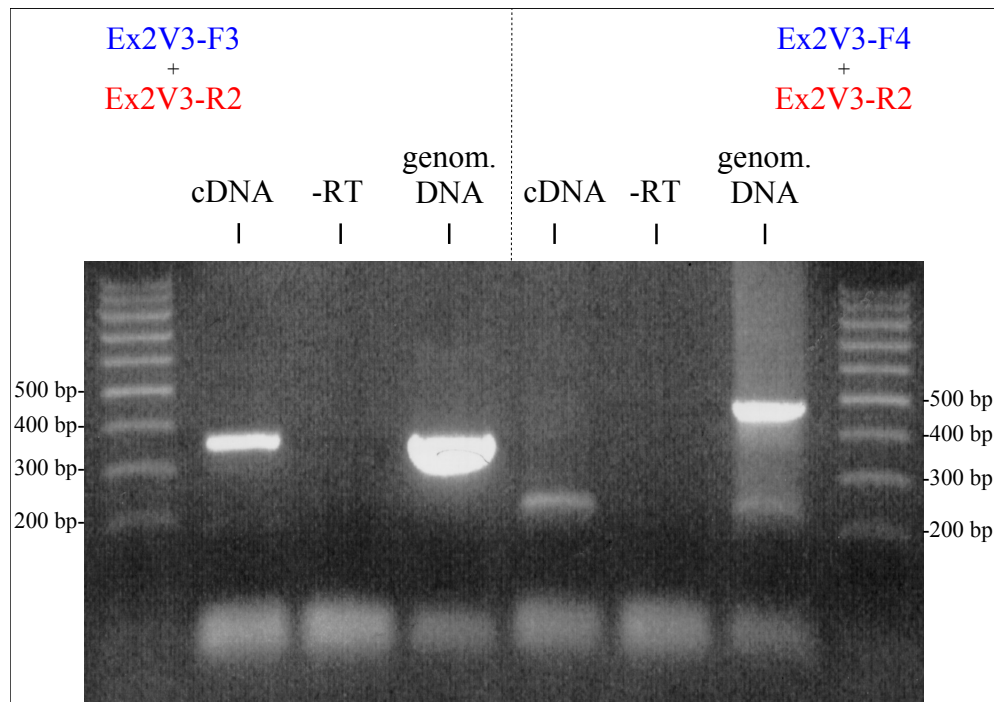


Abb. 12: Test auf größere Exon 2 Verlängerungen. In der linken Hälfte sind die Ex2V3-F3 und in der rechten Hälfte die Ex2V3-F4 Amplifikationen dargestellt. In die jeweiligen Spuren wurden die Amplifikate aus cDNA (cDNA), der Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (-RT), sowie genomischer DNA (genom. DNA) aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter verwendet.

Bei der Amplifikation von cDNA, sowie von genomischer DNA mit der Primerkombination Ex2V3-F3/Ex2V3-R2 wurden PCR-Produkte in der erwarteten Größe von 370 bp gebildet (Abb. 12). Eine Sequenzierung konnte bestätigen, dass es sich um das richtige Produkt handelte. Bei der Kontroll-PCR ohne Reverse Transkriptase (-RT) wurde kein Produkt amplifiziert.

Bei den Experimenten mit der Primerkombination Ex2V3-F4 und Ex2V3-R2 bildete sich nur bei der Amplifikation von genomischer DNA ein, dem Abstand der Primer entsprechendes Fragment von 477 bp. Bei der Amplifikation von cDNA, sowie der Kontrolle ohne Reverse Transkriptase zeigte sich kein solches Fragment. Allerdings trat in der cDNA Spur eine schwache Bande von etwa 240 bp auf. Dieses PCR Produkt findet sich auch in der Amplifikation von genomischer DNA weshalb es auszuschließen ist, dass es sich um ein gespleißtes Transkript handelt. Da der Abstand der Primer größer ist (477 bp), kann es sich nicht um ein Amplifikat aus der gesuchten Region handeln. Vermutlich ist diese Bande durch unspezifisches Hybridisieren der Primer entstanden. Darauf deutet auch der „smear“ bei der Amplifikation genomischer DNA hin. Auf eine Sequenzierung wurde deshalb verzichtet.

4.2 Analyse des Variante 3 Promotors mit Hilfe von Luziferase Assays

Die Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Variante 3 hat gezeigt, dass es sich um ein *TAF1*- Exon- unabhängiges Transkript handelt. Es sollte untersucht werden, wie die Transkription dieser Variante reguliert wird. Es wurde vermutet, dass die Transkription von einem vor dem Transkriptionsstart gelegenen Promotor gesteuert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die transkriptions- stimulierende Wirkung putativer Promotor- Fragmente mit Hilfe von Luziferase Assays untersucht.

4.2.1 Analyse verschieden langer Promotor Fragmente

Dazu wurden verschieden lange Fragmente (639 bp, 253 bp, 137 bp) aus dem Bereich proximal des *DYT3* Exon 2 in den Vektor pGL3-Basic kloniert (Abb. 13). Das längste Fragment wurde auch in inverser Orientierung kloniert. Der Vektor pGL3-Basic besitzt ein für Reporter Assays optimiertes Luziferase- Gen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) [110], jedoch keinen Promotor. Stattdessen befindet sich proximal des Luziferase- Gens eine „Multiple Cloning Site“ um eigene Promotor- Fragmente klonieren zu können.

Alle klonierten Promotor- Fragmente überlappen den Transkriptionsstart bis Position +24 und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe im 5'- Bereich. Eine größere Überlappung wurde vermieden, da bei Position +30 ein Start- Codon (ATG) vorhanden ist. Dieses Start- Codon könnte die Luziferase- Translation stören und folglich die Messungen verfälschen. Die aus den Klonierungen hervorgegangenen Vektoren wurden ihrer Insertgröße entsprechend pGL3-Var3_137, pGL3-Var3_253 und pGL3-Var3_639 genannt. Der Vektor mit dem 639 bp Insert in inverser Orientierung erhält den Namen pGL3-Var3_Neg.

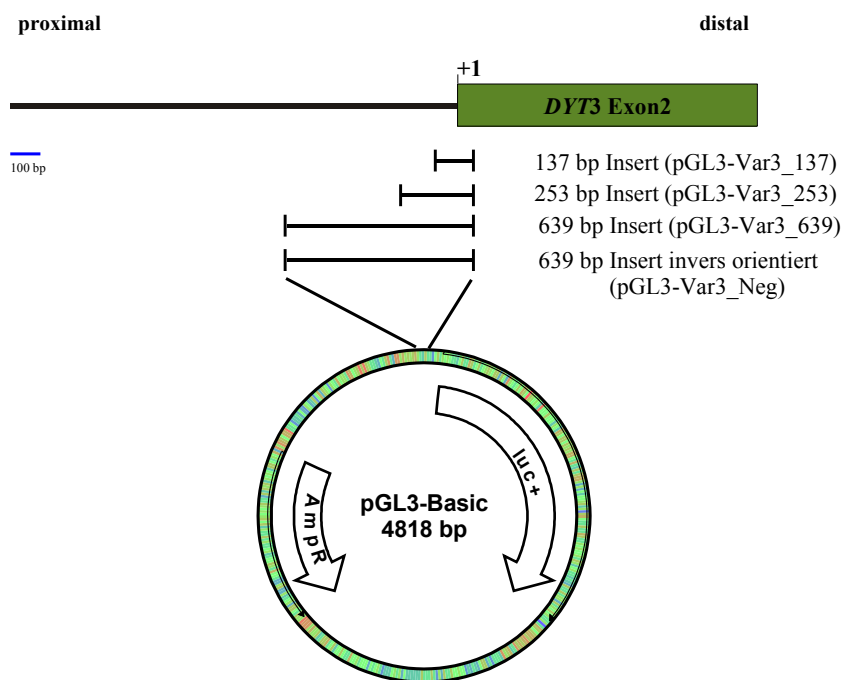


Abb. 13: Klonierung der Variante 3 Promotor- Fragmente. Es wurden ein 137 bp, ein 253 bp und ein 639 bp Fragment in pGL3-Basic kloniert. Das 639 bp Fragment wurde zusätzlich in inverser Orientierung kloniert. Der durch die RACE ermittelte am weitesten proximal gelegene Transkriptionsstartpunkt wird als „+1“ definiert.

Um den transkriptions- stimulierenden Effekt der Promotor- Fragmente zu zeigen, wurden die Vektoren in die humanen Zelllinien NT2/D1 und U87 transfiziert. Zur Normalisierung wurde ein Normalisierungsvektor kotransfiziert, um experimentelle Faktoren wie Transfektionseffizienz und Überlebensrate der Zellen auszugleichen. Dieser Normalisierungsvektor exprimiert konstitutiv eine Luziferase aus der Weichkoralle *Renilla reniformis*. Die transfizierten Zellen exprimieren somit simultan die Luziferasen aus *Photinus pyralis* und aus *Renilla reniformis*. Dabei ist die Menge der gebildeten *Photinus*- Luziferase abhängig von der transkriptions- stimulierenden Aktivität des klonierten Promotor Fragments.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität der Lysate ermittelt. Die Messung beider Enzyme erfolgte seriell im gleichen Ansatz. Zuerst wurde die durch die *Photinus*- Luziferase katalysierte Lumineszenz gemessen. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt und gleichzeitig die *Renilla*- Luziferase aktiviert [111] und deren Aktivität ermittelt.

Zur Auswertung wurden die Messwerte der *Photinus*- Luziferase normalisiert. Anschließend wurden die normalisierten Werte mit denen des promotorlosen pGL3-Basic verglichen. Das Verhältnis ergab die transkriptions- stimulierende Aktivität des klonierten Promotor- Fragments. In Abbildung 14 sind die durch drei unabhängige Messungen ermittelten Werte der Variante 3 Promotor Konstrukte dargestellt.

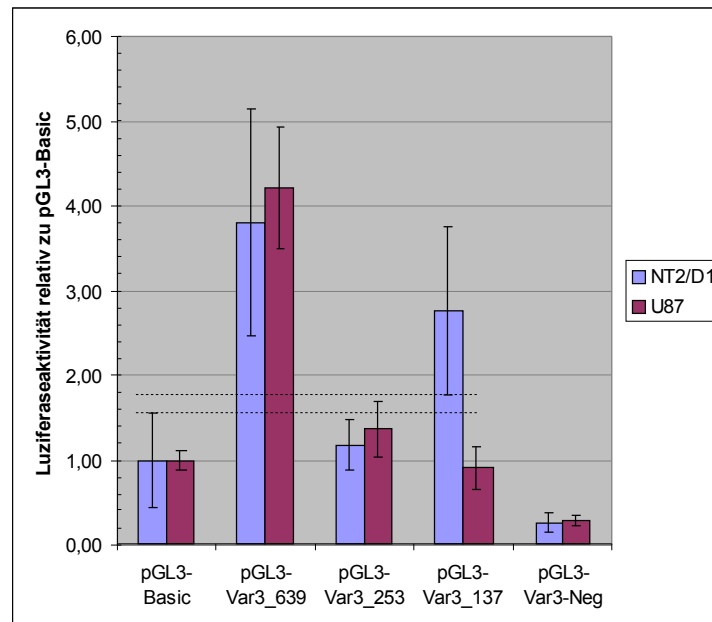


Abb. 14: Luziferaseaktivität der Variante 3 Promotor Fragmente relativ zu pGL3-Basic. Es wurde die Aktivität der Variante 3 Promotor Konstrukte mit dem promotorlosen Vektor pGL3-Basic verglichen. Die Daten für die Zelllinie NT2/D1 sind blau, und für U87 rot dargestellt.

Die Daten zeigen für pGL3-Var3_639 in beiden Zelllinien eine etwa vierfach höhere Aktivität als der Hintergrund (pGL3-Basic). Bei pGL3-Var3_253 ließ sich keine Aktivierung zeigen. Bei dem kürzesten Promotor- Fragment von 137 bp zeigte sich ein Unterschied zwischen NT2/D1 und U87. Während in U87 kein transkriptions- stimulierender Effekt zu beobachten war, lag die Luziferaseaktivität in NT2/D1 um etwa den Faktor 2,5 höher als der Hintergrund. Leider ist dieses Ergebnis aufgrund der großen Standardabweichung nicht deutlich signifikant. Die Bereiche innerhalb der Standardabweichungen überschneiden sich jedoch nicht.

Die Aktivität des invers- orientierten 639 bp Fragments lag bei beiden Zelllinien deutlich unter der von pGL3-Basic.

4.3 Regulation des Variante 3 Promotors

Durch die Versuche aus Abschnitt 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass der Bereich vor Exon 2 Promotoraktivität besitzt. Es sollte nun geklärt werden, wie dieser Promotor reguliert wird. Bei der Analyse wurde insbesondere versucht, für das Gehirn relevante Regulationsmechanismen aufzudecken.

4.3.1 *In silico* Identifikation putativer Transkriptionsfaktor- Bindemotive

Zur *in silico* Analyse des Promotors wurde im Bereich vor Exon 2 nach putativen Transkriptionsfaktor- Bindemotiven gesucht. Dies geschah mit Hilfe der Internet- basierten Suchmaschinen „TESS“ (Transcription Element Search System; <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>) und „Tfsitescan“ (<http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>). „TESS“ durchsucht die eingegebene Sequenz nach Transkriptionsfaktor- Konsensusmotiven und greift hierfür auf die „TRANSFAC“ Datenbank [112] zurück. Viele Konsensusmotive sind jedoch nur wenige Basenpaare lang und oftmals degeneriert. Es findet zwar eine Gewichtung statt (positional weight matrix), nach der bestimmte Basen an einer Position häufiger auftreten, jedoch lieferte die Analyse des Promotorbereichs mit Hilfe von „TESS“ sehr viele Treffer.

„Tfsitescan“ basiert auf der „Object-oriented Transcription Factors Database“ (ooTFD) [113] und kann in der eingegebenen Sequenz nach Ähnlichkeiten zu Transkriptionsfaktor- Bindestellen suchen. Es wird im Gegensatz zu „TESS“ nicht nach Konsensusmotiven gesucht, sondern nach experimentell bestätigten Bindestellen bereits untersuchter Promotoren. Zu jeder Bindestelle wird der dazugehörige Artikel zitiert. Dies erhöht die Qualität der Suche und erleichtert die Auswahl interessanter Bindemotive.

Durch die Kombination der Ergebnisse beider Suchmaschinen, und unter Berücksichtigung einer möglichen Relevanz für die Expression in neuronalem Gewebe, wurden die Transkriptionsfaktoren Ikaros, HIF-1 und MEF2 zur näheren Analyse ausgewählt.

4.3.2 Koexpression von Ikaros Isoform 2 und Isoform 8

Es wurde überprüft, ob der Transkriptionsfaktor Ikaros (oder LyF-1) [114,115] die Aktivität des Variante 3 Promotors beeinflussen kann. Hierfür wurde, wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, die Promotoraktivität mit Hilfe von Luziferase- Assays ermittelt. Die *in silico* Analyse hat gezeigt,

dass es im Bereich proximal Exon 2 mehrere putative Bindemotive für Ikaros gibt. An den Positionen -77 (CCTCCCAA), -1025 (CCTCCCAA) und -1450 (CCTCCCAAG) befinden sich humane Ikaros- Konsensusmotive (TRANSFAC AccNo: T02702) (Abb. 15). An den Positionen -64 (TGGGATT), (TGGGATT) und -1136 (TGGGAAT) befinden sich Motive für das murine Ikaros (TRANSFAC AccNo: T01470). Der Abstand zwischen dem humanen Ikaros Motiv an der Position -77 und dem murinen Ikaros Motiv an Position -64 beträgt 13 Nukleotide. Interessanterweise beträgt auch der Abstand zwischen den Motiven an den Positionen -1025 und -1012 genau 13 Nukleotide. Die Sequenz zwischen den Motivpaaren unterscheidet sich.

Zur Versuchsdurchführung wurde ein Luziferase Reporter Vektor kloniert, der alle *in silico* identifizierten Ikaros Motive enthielt. Hierfür wurde ein größeres Variante 3 Promotor- Fragment von 1644 bp in pGL3-Basic kloniert (Abb 15) und der daraus resultierende Vektor pGL3-Var3_1644 genannt.

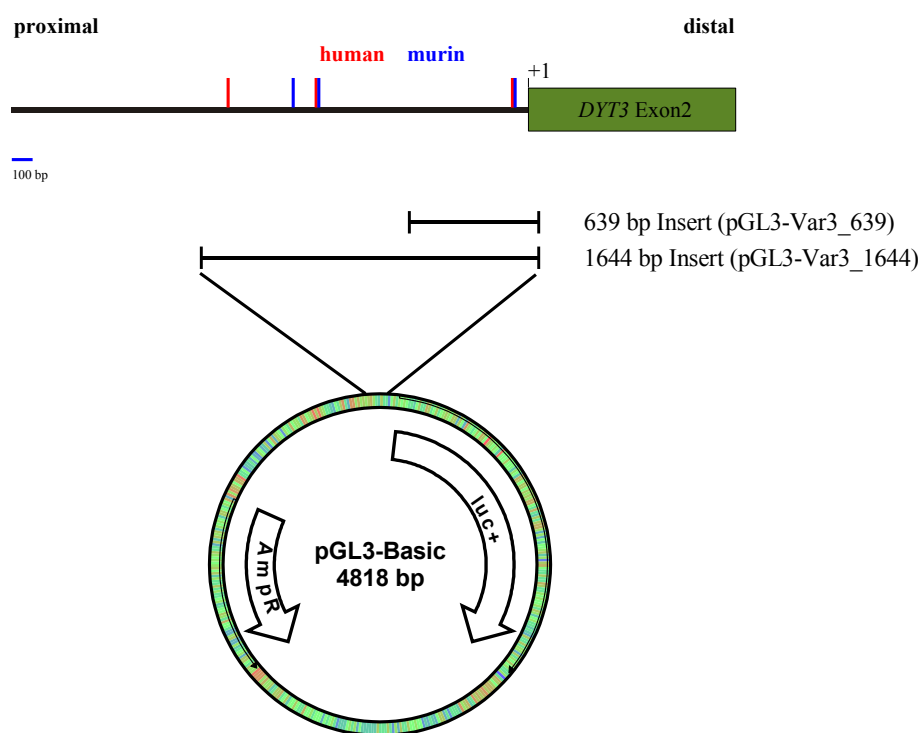


Abb. 15: Klonierung von pGL3-Var3_1644. Ein 1644 bp großes Promotor Fragment wurde in pGL3-Basic kloniert. Zum Vergleich ist das in pGL3-Var3_639 klonierte Fragment abgebildet. Die humanen (rot) und murinen (blau) Ikaros- Konsensusmotive werden als farbige Linien dargestellt.

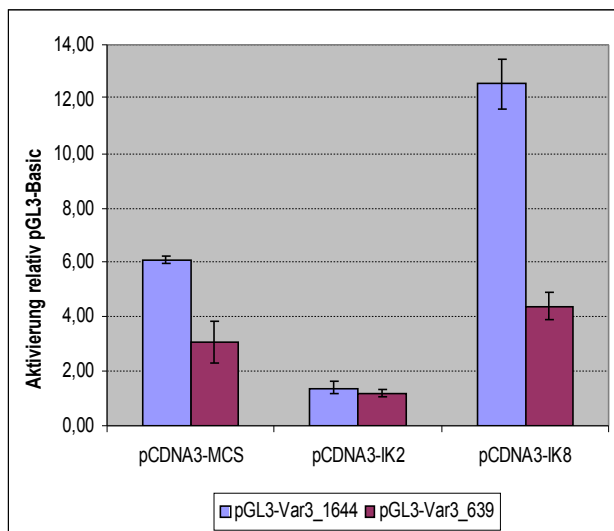
Zusätzlich zu den Reporter- Vektoren pGL3-Var3_1644, pGL3-Var3_639 und dem *Renilla*-Luziferase Normalisierungsvektor wurden Ikaros- exprimierende Plasmide kotransfiziert. Dabei kamen die Expressionsvektoren pCDNA3-IK2 und pCDNA3-IK8 zum Einsatz, welche die Isoformen zwei und acht des humanen Ikaros- Gens überexprimieren. Zur Kontrolle wurde der Expressionsvektor pCDNA3-MCS (ohne Ikaros Konstrukt) kotransfiziert. Das folgende Schema verdeutlicht die durchgeführten Transfektionen.

Transfiziert wurden pro Ansatz:

pGL3-Basic oder pGL3_Var3_1644 oder pGL3-Var3_639
 +
Renilla- Luziferase Normalisierungsvektor
 +
 pCDNA3-MCS oder pCDNA3-IK2 oder pCDNA3-IK8

Die Messungen erfolgten für die Zelllinien NT2/D1 und U87 und wurden in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt (Abb. 16). Die Aktivität der 1644 bp und 639 bp Promotor- Fragmente bezieht sich jeweils auf pGL3-Basic.

a) U87



b) NT2/D1

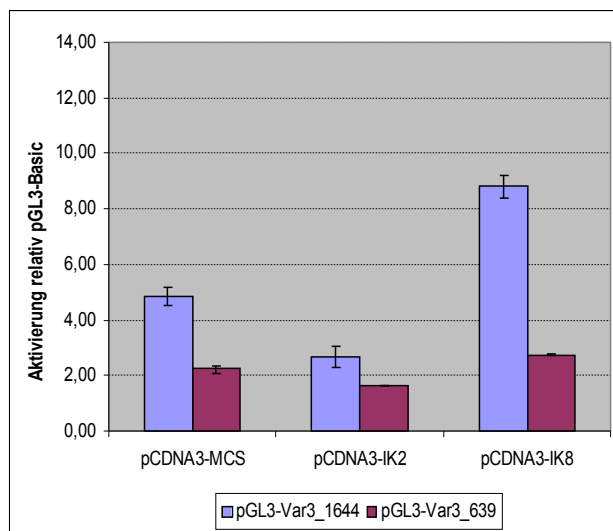


Abb. 16: Promotoraktivität in Ikaros kotransfizierten Zellen. Aktivität der Variante 3 Promotor Fragmente in U87 (a) und NT2/D1 Zellen (b). Die y-Achse zeigt die Luziferaseaktivität der einzelnen Konstrukte relativ zu pGL3-Basic. Es wurde die Aktivität der Plasmide pGL3-Var3_1644 (blau) und pGL3-Var3_639 (rot) gemessen. Die Spalten zeigen die Kotransfektionsexperimente mit dem insertlosen Expressionsvektor pCDNA3-MCS, sowie den Ikaros Isoform 2 und 8 exprimierenden Vektoren pCDNA3-IK2 und pCDNA3-IK8.

Die Daten zeigen für die Zelllinie U87 folgendes. Die Aktivität des 1644 bp Fragmentes liegt bei pCDNA3-MCS Transfektion bei Faktor sechs. Bei Kotransfektion der Ikaros 2 Isoform lässt sich keine Aktivität über Hintergrund mehr nachweisen. Bei Kotransfektion der Ikaros 8 Isoform, wurde eine Aktivierung um etwa den Faktor zwölf gemessen. Das 639 bp Fragment verhält sich ähnlich. Auch hier fällt die Aktivität bei Ikaros 2 Koexpression auf Hintergrundniveau ab. Bei Koexpression der Isoform 8 ist im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Expression nachweisbar. Die Messdaten der Zelllinie NT2/D1 bestätigen diesen Trend. Der Effekt ist nicht so ausgeprägt wie bei U87, jedoch deutlich vorhanden.

Daraus lässt sich schließen, dass der Promotor der Transkriptvariante 3 durch den Transkriptionsfaktor Ikaros reguliert wird. Ikaros Isoform 2 reprimiert die Promotoraktivität, während bei Koexpression der Isoform 8 eine höhere Expression festzustellen war.

4.3.3 Induktion von HIF-1

Der Helix- Loop- Helix Transkriptionsfaktor HIF-1 (TRANSFAC AccNo: T01609) spielt eine wichtige Rolle beim „oxygen sensing“ der Zelle [116,117]. HIF-1, ein Heterodimer, setzt sich zusammen aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Dabei wird HIF-1 β gleichbleibend exprimiert, während HIF-1 α von der zellulären Sauerstoffkonzentration reguliert wird. Unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) erhöht sich die HIF-1 α Konzentration, was wiederum die Dimerbildung begünstigt und somit die Konzentration funktionaler HIF-1 Moleküle erhöht. Der Transkriptionsfaktor kann verstärkt an HIF-1 Motive binden und je nach Gen und Zelltyp die Expression verstärken oder abschwächen [118].

Das HIF-1 Motiv wird als „HRE“ (hypoxia- responsive element) bezeichnet. Das von Wenger und Gassmann vorgeschlagene Konsensusmotiv lautet (T, G, C) (A, G) **CGTG** (C,G, A) (G, T, C) (G, T, C) (G, T, C) [119]. Die Sequenzanalyse des Promotorbereichs der *DYT3* Variante 3 zeigte an den Positionen -54 und -1002 putative, der Konsensussequenz entsprechende HREs. Das Motiv bei Position -54 entspricht dabei weitgehend dem HRE, welches im Promotor- Bereich des Noxa- Gens identifiziert wurde [120]. „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) und „Supershift“ Analysen des Noxa- Promotors haben gezeigt, dass HIF-1 das für die Experimente verwendete Shift- Oligonukleotid (ATTACAGG **CGTG** AGCCACCGCG**T**) bindet. Dieses Oligonukleotid unterscheidet sich nur in der letzten Position von dem im Promotor von Variante 3 identifizierten

putativen HRE an Position -54 (ATTACAGG **CGTG** AGCCACCGCG**C**).

Um zu überprüfen, ob der Promotor von Transkriptvariante 3 durch HIF-1, und damit durch Hypoxie reguliert wird, wurden Luziferase- Promotoranalysen durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Luziferase- Reporter Vektoren transient in U87 Zellen transfiziert und unter normaler (Normoxie) oder reduzierter Sauerstoffkonzentration (1 % O₂) inkubiert. Es wurden Konstrukte mit beiden putativen HRE (pGL3-Var3_1644), einem HRE (pGL3-Var3_639), sowie ohne HRE (pGL3-Var3_639-TS) transfiziert (Abb. 17). Dabei enthält pGL3-Var3_639-TS ein im 3'- Bereich um 93 bp verkürztes Promotor- Fragment aus pGL3-Var3_639, und somit nicht mehr das putative HRE bei Position -54.

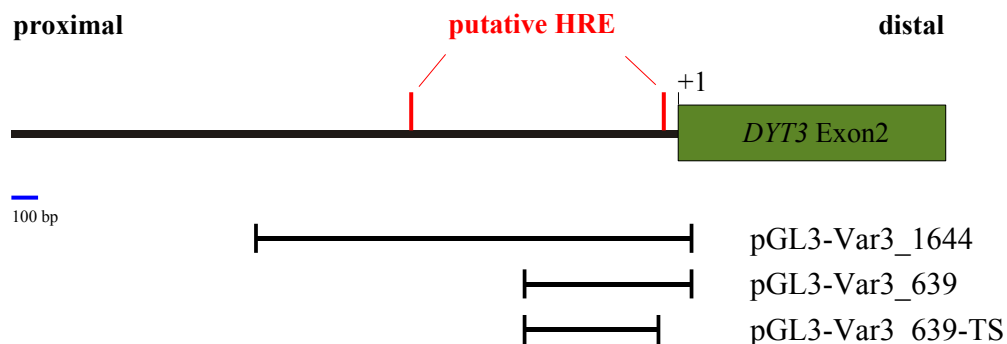


Abb. 17: Promotor- Fragmente zum Nachweis der Hypoxie- Induktion. Dargestellt sind die Positionen der putativen HRE im Variante 3 Promotor- Bereich, sowie die in die Luziferase- Vektoren klonierten Promotor- Fragmente.

Zusätzlich wurde als Positivkontrolle ein Hypoxie- Reporter Vektor transfiziert, um HIF-1 Induktion nachweisen zu können. Mit Hilfe dieses Vektors wurde zuvor die optimale Hypoxie- Inkubationsdauer ermittelt. Es zeigte sich, dass nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden die HIF-1 Induktion am größten war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Zellen in den nachfolgenden Experimenten für 24 Stunden unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität der Zelllysate ermittelt.

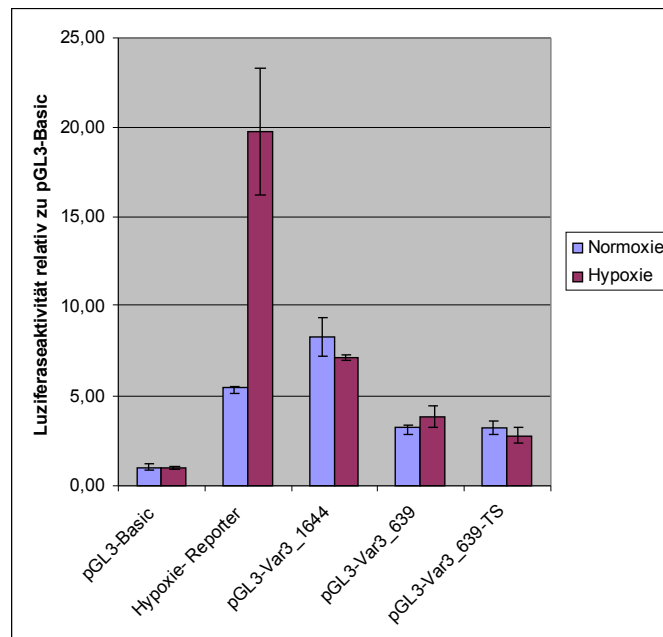


Abb. 18: Luziferaseaktivität bei HIF-1 Induktion. Die Abbildung zeigt die Aktivität der einzelnen Konstrukte relativ zu pGL3-Basic. Die Aktivität bei normoxisch- inkubierten Zellen ist blau und bei hypoxisch- inkubierten Zellen rot dargestellt. (n=3)

Die Auswertung der Daten (Abb. 18) zeigte, dass die Aktivität des Hypoxie- Reporters bei Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen um etwa den Faktor vier zunahm. Dies bestätigt, dass HIF-1 induziert wurde. Bei den Variante 3 Promotor- Konstrukten war keine signifikante Änderung der Aktivität feststellbar. Dies zeigt, dass die *in silico* identifizierten HRE nicht funktional sind, und somit die Expression der *DYT3* Transkriptvariante 3 vermutlich nicht von der Sauerstoffkonzentration reguliert ist. Zusätzlich zeigt das Experiment, dass die Aktivität des 3'-trunkierten Promotorfragments (pGL3-Var3_639-TS) genauso hoch war wie die von pGL3-Var3_639. Dies zeigt, dass der Bereich um den Transkriptionsstartpunkt keinen Einfluss auf die Stärke der Expression hat.

4.3.4 Koexpression von MEF-2C

Die Familie der MEF-2 (myocyte enhancer factor 2) Transkriptionsfaktoren gliedert sich in MEF-2A bis MEF-2D, welche von unterschiedlichen, alternativ gespleißten Genen transkribiert werden [121-124]. Exprimiert werden sie hauptsächlich in Muskelgewebe. Es wurden allerdings auch gehirnspezifisch exprimierte Isoformen (MEF-2C) nachgewiesen [107,125].

MEF-2 Proteine binden als Homo- oder Heterodimer an die Erkennungssequenz C/TTA(A/T)₄TAG/A. An Position -17 und -498 des Variante 3 Promotors befinden sich solche Motive. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob MEF-2C (TRANSFAC AccNo: T01766) einen Effekt auf den Promotor ausübt. Hierfür wurde, ähnlich wie bereits zuvor für die Analyse der Ikaros Motive geschehen, die Luziferaseaktivität der Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Var3_1644 bei MEF-2C überexprimierenden Zellen gemessen. Es wurde der MEF-2C exprimierende Vektor pMEF2C-1.6 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde in Parallelexperimenten der insertlose Expressionsvektor (pMT2) kotransfiziert.

Transfiziert wurden pro Ansatz:
 pGL3-Basic oder pGL3-Var3_1644
 +
Renilla- Luziferase Normalisierungsvektor
 +
 pMEF2C-1.6 oder pMT2

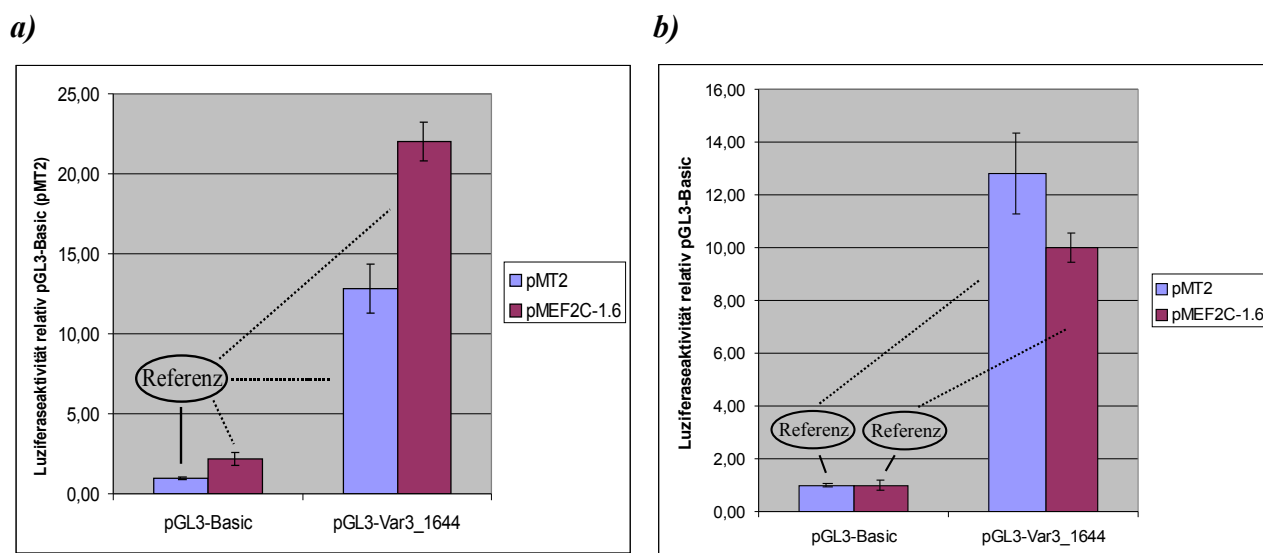


Abb. 19: Promotoraktivität in MEF-2C kotransfizierten Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Var3_1644 in pMT2 (blau) und pMEF2C-1.6 (rot) kotransfizierten Zellen (U87). In der linken Grafik (a) gibt es nur eine Referenz (durchgängige Linie) auf die alle anderen Messwerte bezogen werden (gestrichelte Linien). In der rechten Grafik (b) werden die selben Daten anders dargestellt. Hier werden die Kotransfektionen gesondert betrachtet.

Die Daten zeigen, dass die Luziferaseaktivität bei MEF-2C Kotransfektion im Vergleich zur pMT2 Kotransfektion um etwa den Faktor zwei ansteigt (Abb 19a). Allerdings betrifft dies nicht nur den Vektor mit Variante 3 Promotor Fragment (pGL3-Var3_1644), sondern auch den promotorlosen Vektor pGL3-Basic. Vergleicht man die Luziferaseaktivität von pGL3-Var3_1644 und pGL3-Basic bei pMT2 bzw. pMEF2C-1.6 Kotransfektion untereinander (Abb. 19b), so ist keine Erhöhung sondern eher eine Erniedrigung der Aktivität feststellbar.

4.4 Identifikation eines Exon 4 Gegenstrang- Transkripts

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Identifizierung eines in Exon 4 lokalisierten Gegenstrangtranskripts. Das Transkript wurde näher charakterisiert und der dazugehörige Promotor identifiziert. Außerdem wurde der Transkriptionsstartpunkt identifiziert.

4.4.1 Homologie zwischen humanem und murinem Genom zwischen den Genen *TAF1* und *OGT*

Zur weiteren Analyse des *DYT3* Transkriptbereiches wurde ein Alignment des humanen und murinen Genoms zwischen den Genen *TAF1* und *OGT* durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die *DYT3* Exone 1-5 bei der Maus vorhanden sind. Das Alignment wurde mit Hilfe der „Align two sequences“ Funktion des NCBI- BLAST Servers durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

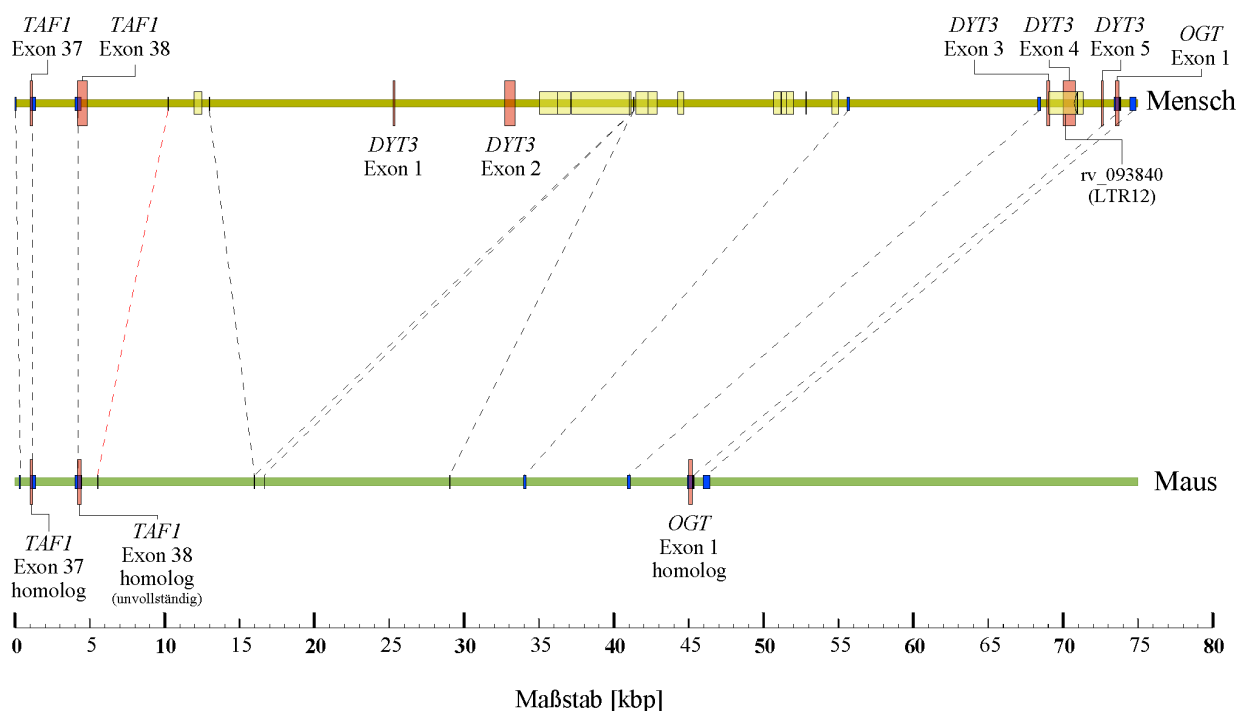


Abb. 20: Homologie zwischen humanem und murinem Genom im Bereich *TAF1* und *OGT*. Das humane Genom ist gelb, das murine Genom grün dargestellt. Exonbereiche werden als rote Balken gezeigt. Im Maus- Genom homologe Regionen werden als blaue Balken dargestellt und sind über gestrichelte Linien mit dem humanen Genom verbunden. Rote Linien kennzeichnen invers orientierte homologe Bereiche. Repeat- Sequenzen retroviralen Ursprungs werden als gelbe Balken dargestellt.

Es zeigte sich, dass es im murinen Genom zu den *TAF1* und *OGT* Exonen homologe Bereiche gibt (Abb. 20). Das *TAF1* Exon 38- Homolog der Maus ist terminal deletiert. Diese Übereinstimmung entspricht den Erwartungen, da die zu *TAF1* und *OGT* homologen Mausgene bereits beschrieben wurden [126,127]. Zu den *DYT3* Exonen homologe Sequenzen finden sich nicht. Es gibt lediglich kurze homologe Bereiche (blau). Im Schimpansen (*Pan troglodytes*) findet sich jedoch eine hohe Konservierung der Exon- Sequenzen. Eine grafische Darstellung wie in Abbildung 20 war jedoch aufgrund fehlender Sequenzinformationen (Assembly PanTro 1.0, Nov 2003; sowie vorläufiges Assembly PanTro 2.1, Mar 2006) nicht möglich.

Vergleicht man den Bereich zwischen *TAF1* und *OGT* so fällt auf, dass das humane Genom im Vergleich zur Maus in diesem Bereich expandiert ist. Zusätzlich finden sich einige repetitive Bereiche retroviralen Ursprungs (gelbe Balken), die der Maus fehlen. Es handelt sich hierbei um Fragmente Humaner Endogener Retroviren (HERV) bzw. LTR Fragmente (siehe Abschnitt 1.3).

4.4.2 *In silico* Identifikation eines LTR mit putativer Promotoraktivität distal Exon 4

Long Terminal Repeats (LTR) können sowohl Promotor- [76] als auch Enhanceraktivität [128] besitzen und die Expression naheliegender Gene beeinflussen [129,130]. In der Region zwischen den Genen *TAF1* und *OGT* wurde eine Reihe solcher LTR Elemente identifiziert. Eines davon überlappt Exon 4 des *DYT3* Transkriptsystems. Exon 4 ist Teil aller identifizierten Transkriptvarianten und beinhaltet die XDP- spezifische Mutation DSC3. Aus diesem Grund wurde der Exon 4 überlappende LTR näher charakterisiert.

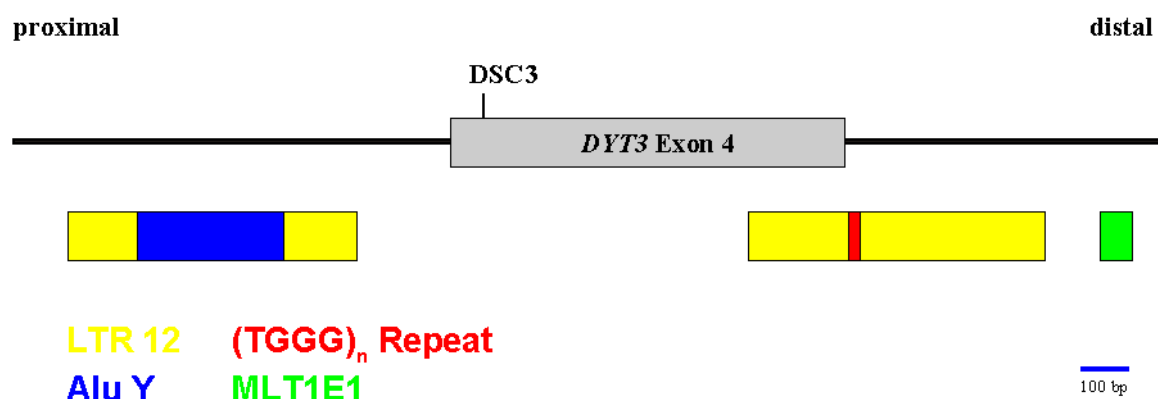


Abb. 21: Repeat- Bereiche um Exon 4. Dargestellt ist der Bereich um Exon 4 des *DYT3* Transkriptsystems, sowie die XDP spezifische Mutation DSC3. In dieser Region gibt es repetitive Bereiche unterschiedlichen Ursprungs, die nach Klassen unterteilt und farblich voneinander abgegrenzt dargestellt werden.

Bei der Sequenzanalyse (Abb. 21) zeigte sich, dass es im Bereich um Exon 4 mehrere repetitive Sequenzen unterschiedlichen Typs gibt. Neben einem Alu Y Repeat, einem TGGG Repeat und einem MLT1E1 (Mammalian LTR Transposon) Repeat finden sich vier LTR 12- Repeat- Bereiche. Vermutlich bilden die beiden distalen LTR- Fragmente zusammen mit dem TGGG Repeat die U3, R, und U5- Regionen eines vollständigen LTR. Bei der Sequenzanalyse zeigte sich, dass das distal Exon 4 gelegenen LTR 12 Fragment Homologie zu einem von La Mantia *et al.* [131] und Strazzullo *et al.* [132] untersuchten LTR 12 Core- Promotor aufweist.

```

→ 521 bp Fragment
AAACTCGAGA TGAGACCCGG GCTGGTGGCT GCTGTTGCAC TGCTGCTGAA AAAAAATGGC TCCAAAGGTT AAATGAAGCC
AAAGAAATAC ATAGATGTGA GAGGAGAAGC CAGCTGGACT TCCTGGGTTG GGTGGGGACT TAAAGAAGTT TTCTGTCTTA
CAAGAGGATT GTAAATGCA CCAATCAGCA CTCTGTAGCT AGGATTGTAA AACGCACCAA TCAGCGCTCT GTGGCTAGCT
AGAGGTTTGT AAAATGCGCC AATCAGTGCT CTGTAAAAAC ACACCAATCA GTGCTCTGTG GCTAGCTAGA GGTTTGAAA

ATGGACCAAT CAGCAGTCTG TAAATGGAC CAATCAGCGC TCTGTAAAT GGACCAATTA GCACCTGTA AAATGGACCA
→ 162 bp Fragment
ATCAGCACTC TGTAAATGG ACCAATCAGC AGGACA TGGG TGGGGCAAA TAAGGG AATA AAA GCTGGCC ACATTCCGCA
→ 105 bp Fragment
Spl-Motiv TATA-Box
CCCACCCACC CACCCACCCA CCAGGCCAGT AGTAGCAACC CACTCGGGTC TCTTTCCACA CCGTGGAAAGC TGTGTTCTTT
3'-Ende Exon4 (Variante 3)

```

Abb. 22: Putativer LTR Promotor. Dargestellt ist der *DYT3* Gegenstrang distal Exon 4. Das 3'- Ende von Exon 4 (Transkriptvariante 3) ist fett gedruckt. U3- Repeatbereiche sind blau hervorgehoben. Das SP1-Motiv und die TATA-Box sind fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Der TGGG Repeat ist grün markiert. Die Grenzen der klonierten Promotor- Fragmente sind rot dargestellt.

Die für die Transkription relevanten Motive finden sich zum Teil auch im distal Exon 4 gelegenen LTR 12 Fragment. So wurde ein putatives SP1- Motiv identifiziert, bei dem jedoch im Vergleich zu dem von La Mantia *et al.* beschriebenen Motiv (TGGGTGGGGC) die letzte Base durch ein Adenin ersetzt ist (Abb. 22). Nach La Mantia *et al.* ist dieses Motiv für die Aktivität des Promotors essentiell.

Beim zweiten Motiv handelt es sich um eine TATA-Box (AATAAAA). Der Abstand des SP1-Motivs von der TATA-Box ist genauso groß wie in der Literatur beschrieben, die Sequenz dazwischen unterscheidet sich jedoch. Nach Strazzullo *et al.* beeinflusst die TATA-Box die Festlegung des Transkriptionsstarts, sowie die Stärke der Initiierung.

Das dritte, von La Mantia *et al.* beschriebene Motiv ist ein Initiator-element (Inr) in Form eines „inverted repeat“ an den Positionen -8/-5 und +1/+4. Dieses Motiv hat keinen Einfluss auf die Promotoraktivität, sondern definiert den Transkriptionsstartpunkt. Das Inr fehlt im LTR 12 distal Exon 4. Stattdessen befindet sich hier ein TGGG Repeat.

Neben diesen Motiven wurden in der U3- Region neun ähnlich aufgebaute Repeats (blau) gefunden, die Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren NF-Y (CCAAT) und F2F (TAAAT) enthalten.

4.4.3 Analyse des putativen LTR Promotors

Es sollte untersucht werden, ob das distal Exon 4 lokalisierte LTR- Element Promotor- sowie Enhanceraktivität besitzt.

4.4.3.1 Nachweis der Promotoraktivität mit Hilfe von Luziferase Assays

Um zu zeigen, dass das LTR Element distal Exon 4 tatsächlich Promotoraktivität besitzt, wurde die Aktivität verschieden langer LTR- Fragmente mit Hilfe von Luziferase Assays in den Zelllinien NT2/D1 und U87 gemessen. Hierfür mussten die LTR- Fragmente in pGL3-Basic kloniert werden (Abb. 23).

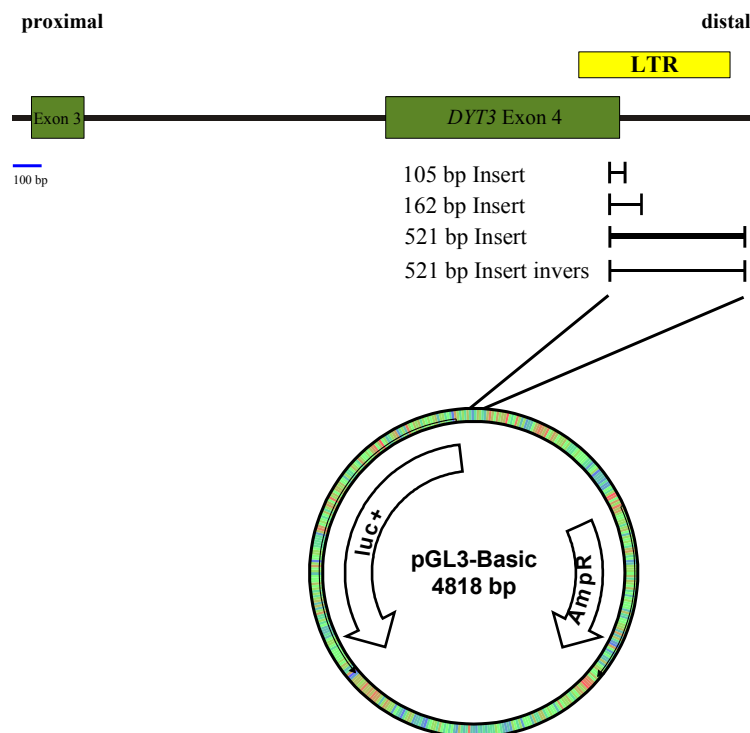


Abb. 23: Klonierung der LTR Promotor- Fragmente. Es wurden ein 105 bp, ein 162 bp und ein 521 bp Fragment in pGL3-Basic kloniert. Das 521 bp Fragment wurde zusätzlich in inverser Orientierung kloniert.

Die klonierten Fragmente unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe im distalen Bereich. Es sei nochmals erwähnt, dass der LTR Promotor im *DYT3* Gegenstrang vermutet wird. Folglich ist der

3'-Bereich des LTR Promotors proximal, und der 5'-Bereich distal lokalisiert. Aus diesem Grund ist das Luziferase-Gen in Abbildung 23 im Vergleich zu den Variante 3 Promotor Klonierungen entgegengesetzt orientiert.

Die LTR Promotor Fragmente überlappen das 3'-Ende von Exon 4 der *DYT3* Transkriptvariante 3 um 13 bp. Es wurden Inserts mit einer Länge von 521 bp, 162 bp und 105 bp kloniert, das größte auch in inverser Orientierung. (Die effektive Länge der LTR Fragmente ist aufgrund der Schnittstellen-Überhänge um jeweils 6 bp geringer.) Das 521 bp Insert überspannt die komplette LTR Region distal Exon 4, sowie den TGGG Repeat und 25 bp des proximalen LTR 12 Elements (siehe Abb. 22). Das 162 bp Insert überspannt nur einen Teil des LTR Elements. Einige der *in silico* identifizierten Bindemotive sind nicht mehr enthalten (Abb. 22). Das 105 bp Insert umfasst nur noch das für die Transkription essentielle SP1-Motiv, sowie die TATA-Box, jedoch keine weiteren, *in silico* identifizierten Motive.

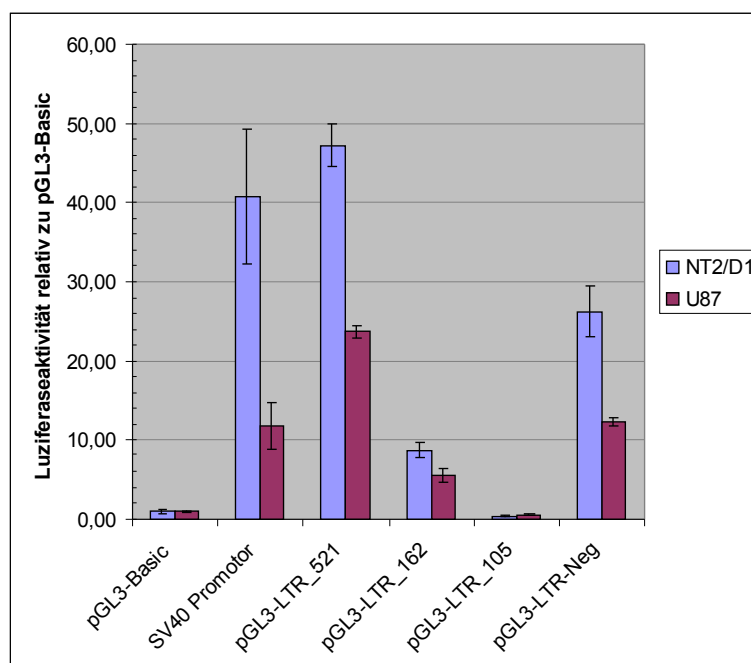


Abb. 24: Luziferaseaktivität der LTR Promotor Fragmente relativ zu pGL3-Basic. Dargestellt ist die Aktivität der verschieden langen LTR Promotor Fragmente in Bezug zu pGL3-Basic in den Zelllinien NT2/D1 und U87. Zum Vergleich wurde der Vektor pGL3-Promoter (SV40 Promotor mitgemessen (n=3).

Die so klonierten Vektoren wurden ihrer Insertgröße entsprechend pGL3-LTR_521, pGL3-LTR_162 und pGL3-LTR_105 genannt. Der Vektor mit dem invers orientierten 521 bp Insert

erhielt den Namen pGL3-LTR-Neg. Die Luziferase- Konstrukte wurden zusammen mit dem *Renilla* Normalisierungsvektor in die Zelllinien NT2/D1 und U87 kotransfiziert. Als Referenz wurde pGL3-Basic verwendet. Außerdem wurde der Vektor pGL3-Promoter mitgemessen. Es handelt sich hierbei um einen pGL3- Vektor mit SV40 Promotor.

Die Daten (Abb. 24) zeigen für das längste LTR Promotor Fragment (521 bp) eine um den Faktor 47 (NT2/D1) bzw. 24 (U87) höhere Aktivität als beim promotorlosen Vektor pGL3-Basic. Die Aktivität von pGL3-LTR_162 liegt neun- (NT2/D1) bzw. sechsfach (U87) über der von pGL3-Basic. Der Vektor pGL3-LTR_105 zeigte in beiden Zelllinien eine geringere Aktivität als der promotorlose Vektor. Der zum Vergleich mitgemessene pGL3-Promoter (SV40 Promotor) hatte, bezogen auf pGL3-Basic, eine um den Faktor 41 (NT2/D1) bzw. 12 (U87) höhere Aktivität. Die Aktivität des invers- orientierten 521 bp LTR- Inserts lag 26-Fach (NT2/D1) bzw. 12-Fach (U87) über dem Hintergrund.

4.4.3.2 Untersuchungen zur Enhanceraktivität des LTR

In Abschnitt 4.4.3.1 wurde gezeigt, dass das LTR Element distal Exon 4 Promotoraktivität besitzt. Nun sollte geklärt werden, ob dieses LTR Element Enhanceraktivität aufweist. Dies könnte für die Regulation des *DYT3* Transkriptsystems bzw. der Transkriptvariante 3 von Bedeutung sein.

Um Enhanceraktivität nachzuweisen, wurde das längste LTR Fragment (521 bp) in „sense“- und in „antisense“- Orientierung stromabwärts des Luziferasegens in die Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Var3_639 kloniert (Abb. 25).

Die neuen Vektoren wurden hinsichtlich ihrer Promotor- und Enhancerbereiche benannt. Die aus pGL3-Basic hervorgegangenen Vektoren wurden pGL3-Basic_LTRenh_s und pGL3-Basic_LTRenh_as genannt. Dabei geben das „s“ bzw. „as“ am Ende der Vektorbezeichnung die Orientierung des LTR Fragmentes an. Wie in Abschnitt 4.4.3.1 gezeigt wurde, besitzt das LTR Fragment bidirektionale Promotoraktivität. Bei „s“ ist die Richtung in der die stärkere Transkription erfolgt, mit der Transkriptionsrichtung des Luziferase Gens identisch. Bei „as“ ist das LTR Fragment entgegengesetzt orientiert .

Die aus pGL3-Var3_639 hervorgegangenen Vektoren enthalten das 639 bp Fragment aus dem Promotor der Variante 3 und wurden pGL3-Var3_639_LTRenh_s und pGL3-Var3_639_LTRenh_as genannt. Die LTR Fragment- Orientierung erfolgte analog zu den promotorlosen Konstrukten durch die Bezeichnungen „s“ bzw. „as“.

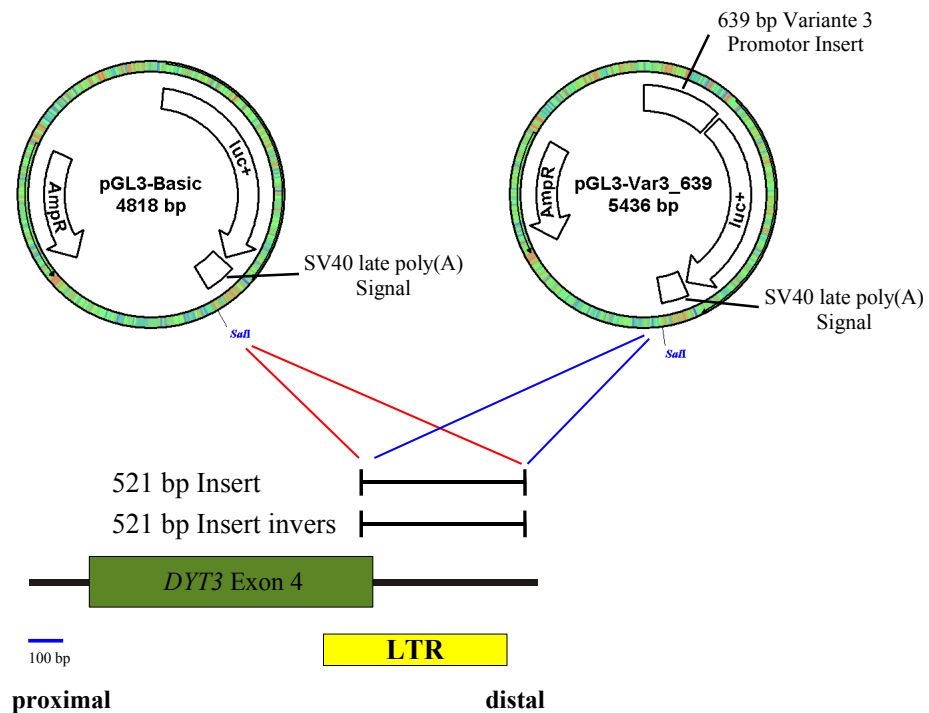
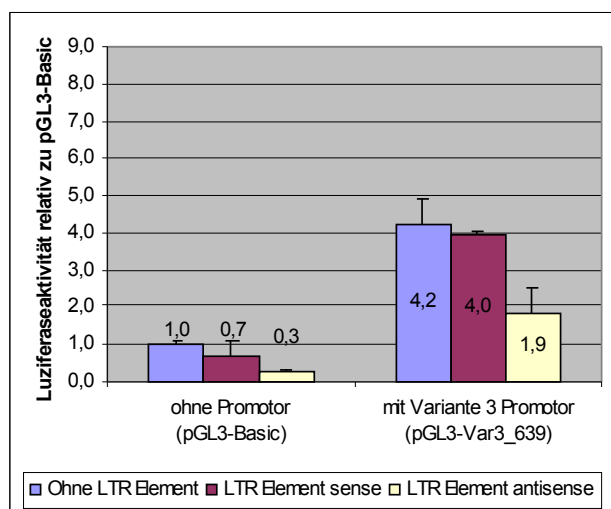


Abb. 25: Klonierung der LTR Enhancer Konstrukte. Das 521 bp LTR Fragment wurde in sense und antisense Orientierung in die *SalI* Schnittstelle der Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Var3_639 kloniert.

Die Vektoren wurden in je vier unabhängigen Experimenten transient in die Zelllinien NT2/D1 und U87 transfiziert. Normalisiert wurde mit Hilfe des *Renilla* Normalisierungsvektors. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

Die Daten zeigen für die Zelllinien U87 und NT2/D1 ein unterschiedliches Bild. Bei U87 (Abb. 26a) wurde die Luziferaseaktivität durch Integration des LTR- Elements in „sense“- Orientierung nicht beeinflusst. Sowohl bei den pGL3-Basic als auch bei pGL3-Var3_639 basierten Vektoren zeigte sich kein Unterschied. Die Integration des LTR- Elements in „antisense“- Orientierung hingegen führte zu einer Abnahme der Luziferaseaktivität sowohl in den promotorlosen als auch in den Vektoren mit Variante 3 Promotor- Fragment. Die Aktivität sank bei pGL3-Basic durch Integration des LTR- Elements in „antisense“- Orientierung von 1 auf 0,3. Bei pGL3-Var3_639 sank die Aktivität von 4,2 auf 1,9.

a) U87



b) NT2/D1

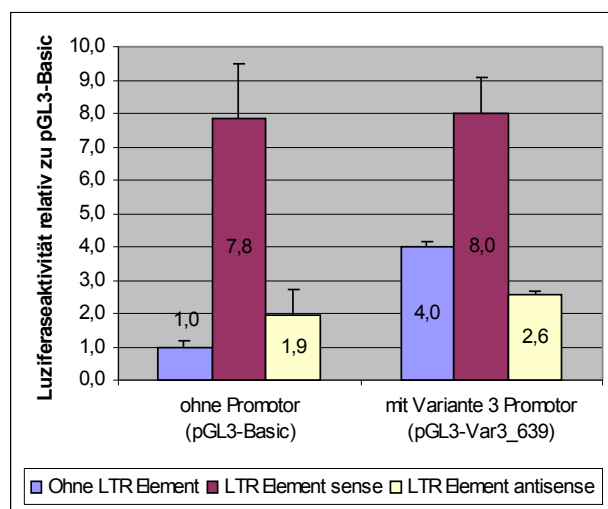
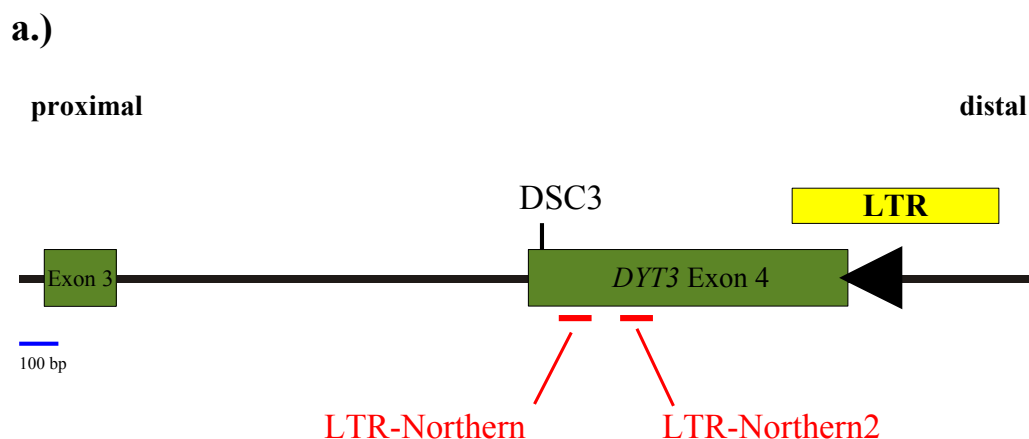


Abb. 26: Luziferaseaktivität der Enhancer Konstrukte relativ zu pGL3-Basic. Dargestellt ist die Luziferaseaktivität in den Zelllinien U87 (a) und NT2/D1 (b). In den jeweils linken Spalten sind die promotorlosen Vektoren (pGL3-Basic) und in den rechten Spalten die Vektoren mit Variante 3 Promotor Fragment (pGL3-Var3_639) gruppiert. Die farbigen Balken geben an, ob und in welcher Orientierung der Vektor das LTR Element in der *SaII* Schnittstelle inseriert hatte. (n=4)

Bei NT2/D1 Zellen (Abb. 26b) zeichnete sich ein anderes Bild ab. Hier führte die Integration des LTR- Elements in „sense“- Orientierung zu einer Zunahme der Luziferaseaktivität. Bei den pGL3-Basic Konstrukten stieg die Aktivität von 1 auf 7,8 und bei den pGL3-Var3_639 Konstrukten von 4 auf 8. Die Integration in „antisense“- Orientierung führte bei pGL3-Basic zu einem schwachen Anstieg der Luziferaseaktivität von 1 auf 1,9. Bei pGL3-Var3_639 bewirkte die Integration des LTR- Elements in „antisense“- Orientierung eine Abnahme der Luziferaseaktivität von 4 auf 2,6.

4.4.4 In vivo Nachweis des Gegenstrang Transkripts durch „Northern Blot“

Die vorausgegangenen Experimente konnten zeigen, dass es sich bei dem LTR- Element distal Exon 4 um einen bidirektionalen Promotor handelt. Eines der von diesem LTR- Promotor getriebenen Transkripte wäre komplementär zu Exon 4 und somit ein *DYT3* Gegenstrangtranskript. Die bisherigen Luziferase- Experimente zur Analyse des LTR 12 distal Exon 4 konnten zwar Promotoraktivität zeigen, jedoch ist dies kein Beweis für die Existenz eines LTR 12 getriebenen Gegenstrangtranskriptes. Aus diesem Grund wurde versucht, dieses Transkript in vivo nachzuweisen. Hierfür wurden „Northern Blot“ Hybridisierungen durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche „Multiple Tissue Northern Blots“ der Firma Clontech verwendet. Dadurch konnte ein breites Spektrum von RNA aus verschiedenen humanen Gewebetypen und Hirnregionen abgedeckt werden. Als Sonden wurden endständig radioaktiv- markierte Oligonukleotide verwendet. Dadurch konnte strangspezifisch hybridisiert werden, was für den Nachweis unerlässlich war. Obwohl Sonden- Homologie zu anderen Genombereichen durch „BLAST“ Analyse ausgeschlossen wurde, könnte es trotzdem zu unerwünschtem Hybridisieren an partiell homologen RNAs kommen. Dies würde zu falsch- positiven Ergebnissen führen. Um dies auszuschließen, wurden zwei unterschiedliche Sonden verwendet (Abb. 27).



b.)

LTR-Northern: AGGACTACAGTGAGGATTGTGGAGGGAAGTGGACCTT

LTR-Northern2: AGTATCCTCATCTGGCAGAACTCCCATAGGGTGTGCTC

Abb. 27: Darstellung der für die „Northern Blots“ verwendeten Sonden. (a) Die Abbildung zeigt die Positionen, der für die Hybridisierungen verwendeten Sonden LTR-Northern und LTR-Northern2. Die in den Luziferase- Experimenten ermittelte stärkere Promotoraktivität des LTR wird durch den schwarzen Pfeil am Ende von Exon 4 symbolisiert. (b) Angabe der Sondensequenzen.

Zuerst wurde eine Sonde (LTR-Northern) hybridisiert. Dann wurde gewaschen und exponiert. Nach der Filmentwicklung wurde die Sonde vom Blot gewaschen und durch erneute Exposition bestätigt, dass die Sonde vollständig entfernt wurde. Anschließend wurde die zweite Sonde (LTR-Northern2) hybridisiert. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der Sonde LTR-Northern.

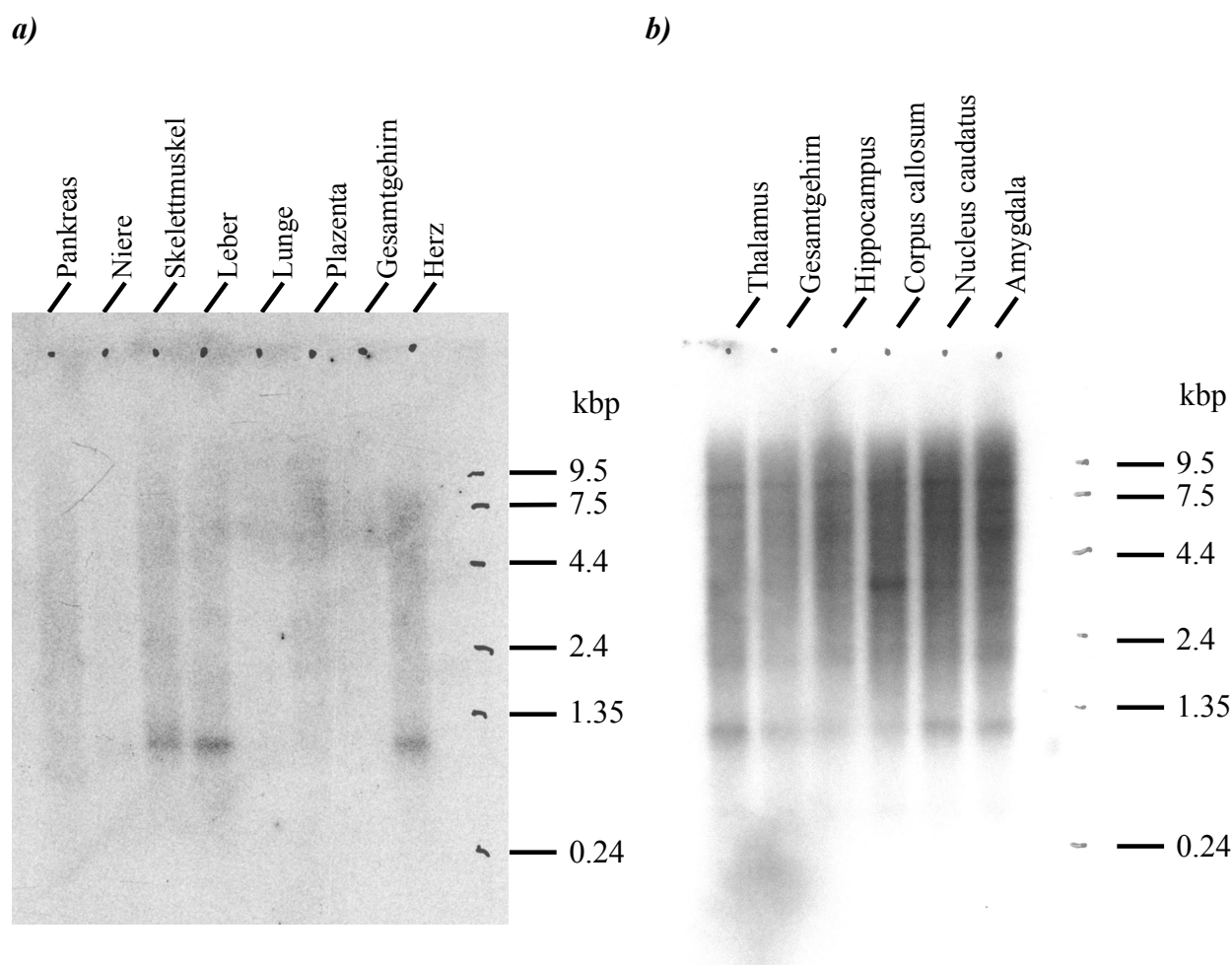


Abb. 28: Hybridisierung der Multiple Tissue Northern Blots mit LTR-Northern. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der einzelsträngigen Oligonukleotid- Sonde LTR-Northern. Pro Spur wurden vom Hersteller (Clontech) 2 µg poly(A)+ RNA aus verschiedenen Organen (a), bzw. Hirnregionen (b) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem Größenbereich von 9500 bp bis 240 bp.

Abbildung 28a zeigt etwa 1000 bp große Banden in der Skelettmuskel, Leber und Herzspur. In allen anderen Spuren findet man kein Signal. Der Hintergrund ("smear") ist bei den Niere-, Lunge- und Gesamtgehirn- Spuren schwächer ausgeprägt. Dies könnte auf geringere RNA- Mengen in diesen Spuren hindeuten.

Bei der Auswertung des Blots aus verschiedenen Gehirnregionen (Abb. 28b), zeigen sich auch Banden von 1000 bp Größe. Diese finden sich in RNAs aller Regionen. In den Gesamtgehirn-,

Hippocampus- und Corpus callosum- Spuren ist die Bande etwas schwächer. Der Hintergrund ist bei allen Proben ähnlich stark. Zusätzlich erhält man in allen Spuren sehr schwache Hybridisierungssignale bei etwa 2300 bp und 8000 bp, in der Corpus callosum Spur zusätzlich ein etwas stärkeres Signal bei etwa 4000 bp.

Um falsch- positive Signale aussortieren zu können, wurden die Blots „gestripped“ (sehr stringent gewaschen) und anschließend die Sonde LTR-Northern2 hybridisiert.

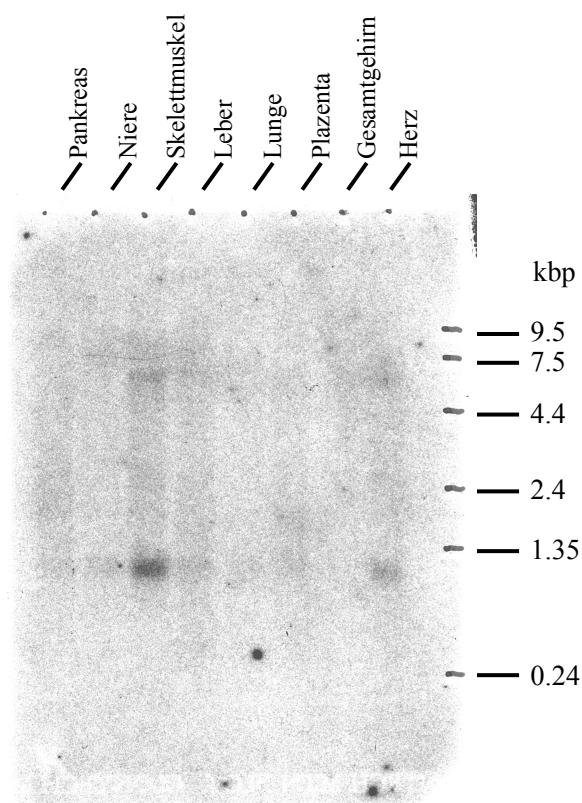


Abb. 29: Hybridisierung des Multiple Tissue Northern Blots mit LTR-Northern2.
Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der Sonde LTR-Northern2.

Die Auswertung der Hybridisierung mit der Sonde LTR-Northern2 (Abb. 29) zeigt wieder eine Bande bei 1000 bp in der Skelettmuskel und in der Herzs pur. Die Bande in der Leberspur ist deutlich schwächer als bei der LTR-Northern Hybridisierung. Außerdem traten extrem schwache 1000 bp Banden in den anderen Spuren auf. Zusätzlich dazu gibt es bei etwa 7000 bp eine weitere Bande in der Skelettmuskelspur.

Die Abbildung der Hybridisierung des zweiten Blots (verschiedene Gehirngewebe) war aufgrund zu schwacher Signale nicht möglich. Allerdings war mit bloßem Auge auch hier eine 1 kbp Bande

sichtbar.

Zusätzlich zu den hier gezeigten Daten sei noch erwähnt, dass von D. Nolte durchgeführte Experimente (unveröffentlicht) mit einer einzelsträngigen Oligonukleotidsonde im Bereich DSC3 die gleiche 1000 bp Bande gezeigt haben. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dieser Bande um das gesuchte, LTR- Promotor getriebene Gegenstrangtranskript in Exon 4 handelt.

4.4.4.1 Normalisierung der Blots durch β -Actin Hybridisierung

Zur Normalisierung wurde eine random- markierte β - Actin Sonde verwendet. Als Sondentemplate diente ein 838 bp großes PCR- Fragment, welches einen Großteil des Actin- Leserahmens überspannt.

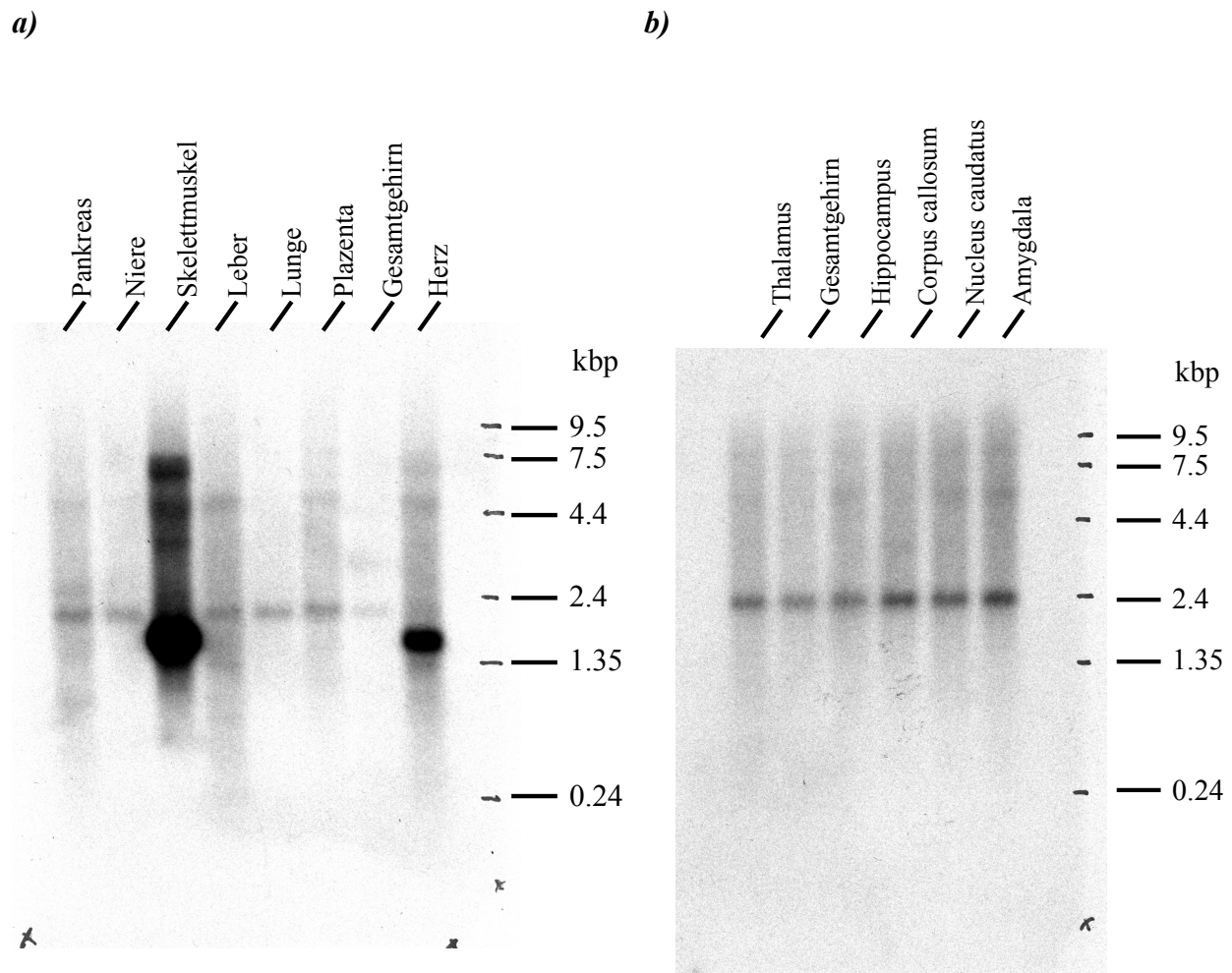


Abb. 30: Normalisierung durch β - Actin. Dargestellt sind die Hybridisierungen der Blots mit einer β - Actin Sonde. Es wurden die gleichen Blots wie für die Hybridisierung der LTR- Sonden verwendet. Die starken Signale in der Skelettmuskel- und Herzspur werden durch das in diesen Geweben exprimierte α - Actin hervorgerufen.

Die Abbildung 30a zeigt das Ergebnis der Hybridisierung der β - Actin Sonde. Etwas unterhalb von 2,4 kbp findet man in allen Spuren ein Signal. Es handelt sich hierbei um die gesuchten β - Actin Banden. Humane β - Actin mRNA hat ohne polyA- Schwanz eine Länge von 1793 bp. Die β - Actin Banden sind etwa gleich intensiv. Lediglich in der Gesamtgehirn Spur ist das Signal deutlich schwächer. In der Skelettmuskel- und Herzspur finden sich bei etwa 1,7 kbp sehr starke Banden, die vermutlich durch Hybridisierung mit α - Actin hervorgerufen wurden. Zusätzlich gibt es im Bereich zwischen 4,4 kbp und 9,5 kbp mehrere Signale, die in der Skelettmuskelspur am deutlichsten ausgeprägt sind.

Die Analyse des Blots mit RNA aus verschiedenen Gehirnregionen (Abb. 30b) zeigt ausschließlich die gesuchten β - Actin Signale. Hier sind die Intensitäten der Thalamus-, Gesamtgehirn- und Hippocampus- Banden etwa gleich. Das Signal in den Corpus callosum-, Nucleus caudatus- und Amygdala- Spuren ist etwas stärker als bei den drei zuvor genannten Regionen.

4.4.5 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes des Gegenstrang Transkripts

Die „Northern Blot“ Experimente konnten zeigen, dass es in Exon 4 ein Gegenstrangtranskript gibt. Dieses Transkript wird vermutlich von dem distal Exon 4 lokalisierten LTR- Promotor gesteuert. Nun sollte mit Hilfe von 5'- RACE Experimenten der Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden.

4.4.5.1 5'- RACE an Luziferase- Vektor- Transkripten

Zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten wurden 5'- RACE Experimente an Luziferasevektoren durchgeführt. Hierfür wurde ein im 3'- Promotor- Bereich um 31 Nukleotide verlängertes LTR Fragment amplifiziert und in pGL3-Basic kloniert (Abb. 31). Dies sollte gewährleisten, dass auch weiter stromabwärts gelegene Transkriptionsstartpunkte erfasst werden. Der neu klonierte Vektor wurde pGL3-LTR_552 genannt.

Der Vektor (pGL3-LTR_552) wurde transient in NT2/D1 Zellen transfiziert. Anschließend wurde Gesamt- RNA isoliert (mit DNase Verdau) und daraus 5'- RACE READY cDNA hergestellt. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angefertigt, um später genomische Kontamination der cDNA ausschließen zu können. Als genspezifischer Primer für die erste Amplifikation wurde Luc-R verwendet, der im Luziferase- Gen des pGL3-LTR_552 Vektors

bindet (Abb. 31). In der Nested- PCR wurde der Primer GLprimer2 eingesetzt, der im 5'- Bereich des Luziferase- Gens bindet.

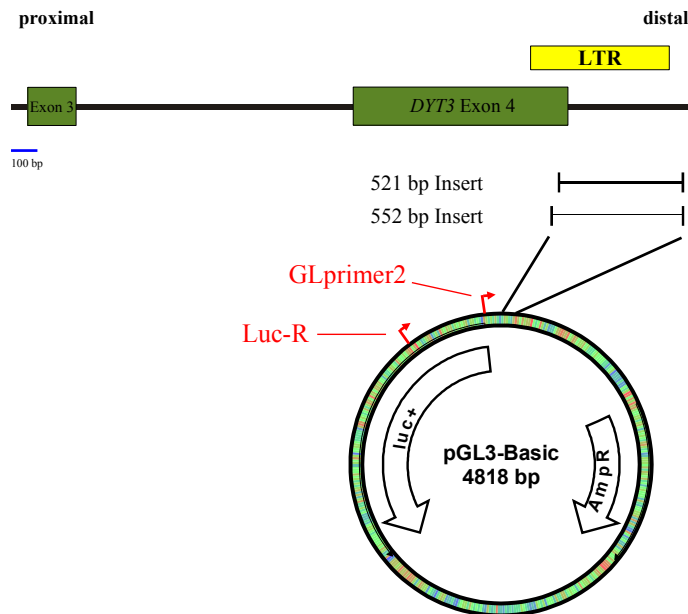


Abb. 31: Klonierung eines 552 bp LTR- Promotor Fragments. Die Abbildung zeigt das im Vergleich zu dem 521 bp Fragment um 31 Nukleotide verlängerte 552 bp Fragment. Die Verlängerung befindet sich im 3'- Bereich des Promotors (Gegenstrang). Die für die RACE verwendeten Primer (Luc-R und GLprimer2) sind rot dargestellt.

Die Auswertung des Gelfotos (Abb. 32) zeigte, dass nach der ersten PCR mit dem Primer Luc-R kein PCR- Produkt sichtbar wurde. Dies gilt gleichfalls für die Negativkontrolle (-RT). Nach der Nested- PCR zeigten sich zwei Banden bei etwa 270 bp und 310 bp. Bei der Negativkontrolle erhielt man kein spezifisches PCR- Produkt, sondern nur eine diffuse Primer- Dimer Bande.

Das Produkt der nested PCR wurde gereinigt und in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert. Anschließend wurden die Vektor- Inserts sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei den beiden Banden aus der Nested- PCR um RACE- Verlängerungen handelte.

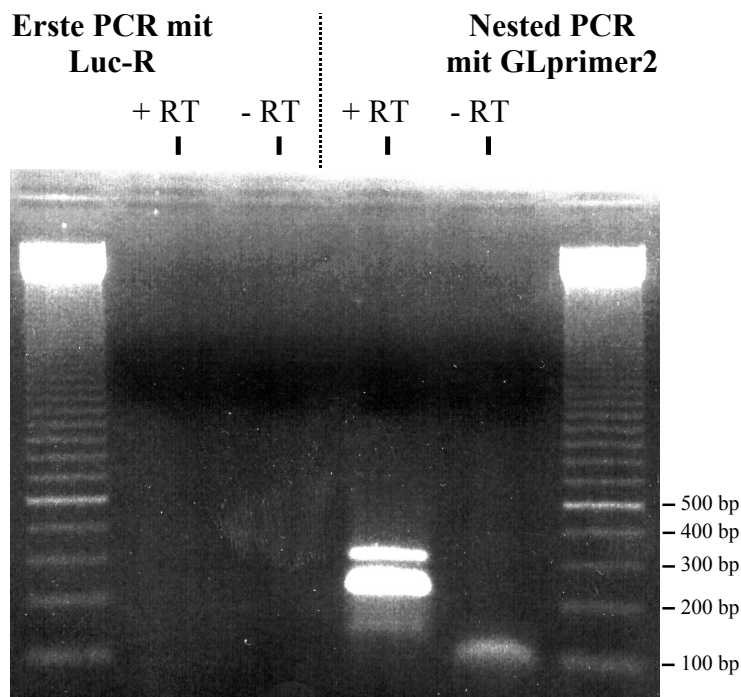


Abb. 32: LTR 5'- RACE Amplifikationen. Im linken Teil des Gelfotos sind die PCR- Produkte der Luc-R Amplifikationen dargestellt. Die Kontrolle ohne Reverse Transkriptase wurde in der -RT Spur aufgetragen. Auf der rechten Seite wurden die PCR- Amplifikate der GLprimer2 Nested- PCR aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter verwendet.

→ 552 bp Insert

```

AAACTCGAGA TGAGACCCGG GCTGGTGGCT GCTGTGCAC TGCTGCTGAA AAAAAATGGC TCCAAAGGTT AAATGAAGCC
AAAGAAATAC ATAGATGTGA GAGGAGAAGC CAGCTGGACT TCCTGGGTTG GGTGGGGACT TAAAGAACTT TTCTGTCTTA
CAAGAGGATT GTAAATGCA CCAATCAGCA CTCTGTAGCT AGGATTGTAA AACGCACCAA TCAGCGCTCT GTGGCTAGCT
AGAGGTTTGT AAAATGCGCC AATCAGTGCT CTGTAAAAAC ACACCAATCA GTGCTCTGTG GCTAGCTAGA GGTTTGTA
ATGGACCAAT CAGCAGTCTG TAAATGGAC CAATCAGCGC TCTGTAAAT GGACCAATTA GCACCTTGTAA AAATGGACCA
ATCAGCACTC TGTAAATGG ACCAATCAGC AGGACA TGGG TGGGCAAAA TAAGGGAATA AAAAGCTGGCC ACATTCCGCA
                                     Spl1-Motiv TATA-Box

+1                                     +42
CCCACCCACC CACCCACCCA CCAGGCCAGT AGTAGCAACC CACTCGGGTC TCTTTCCACA CCGTGAAGC TGTGTTCTTT
AA GCAGTGGTAT CAACGCAGAG TACGCGGG
3'-Ende Exon4 (Variante 3)

```

Abb. 33: Identifizierte Transkriptionsstartpunkte. Die Abbildung zeigt den *DYT3* Gegenstrang distal Exon 4. Das SP1- Motiv und die TATA- Box sind fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Der in pGL3-LTR 552 klonierte Bereich ist durch magentafarbene Pfeile markiert. Die durch die RACE ermittelten Transkriptionsstartpunkte werden als +1 und +42 definiert. Die BD SMART II A Oligo-Sequenz ist gelb dargestellt.

Abbildung 33 zeigt die mit Hilfe der RACE ermittelten Transkriptionsstartpunkte. Der als +1 definierte Transkriptionsstartpunkt entspricht der 310 bp Bande (Abb. 32) und der Startpunkt bei +42 entspricht der 270 bp Bande. Vereinzelt wurden auch andere, kürzere RACE- Verlängerungen ermittelt (nicht gezeigt). Diese konnten jedoch in einem unabhängigen Wiederholungsexperiment nicht bestätigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um unvollständige 5'-Verlängerungen handelte. Die Tatsache, dass bei den Wiederholungsexperimenten ausschließlich die 310 bp und 270 bp Banden amplifiziert wurden deutet darauf hin, dass die Transkription durch den LTR- Promotor an zwei definierten Startpunkten (+1 und +42) initiiert wird.

Der Transkriptionsstartpunkt bei Position +42 (TCTCTTT...) wurde bei allen durchgeführten Experimenten ermittelt. Die Sequenz vor diesem Startpunkt lautet „AGTAGCAACC CACTCGGG“. Damit sind die vier letzten Basen (CGGG) Homolog zum 3'- Ende des BD SMART II A Oligonukleotids (vgl. Abb. 33). Sollte das BS SMART II A Oligonukleotid aufgrund dieser Homologie während der Amplifikation hybridisiert sein, so würde es sich nicht um einen Transkriptionsstartpunkt, sondern um ein PCR Artefakt handeln. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da eine „Hot Start“ Polymerase verwendet wurde und dieses Amplifikat (die 270 bp Bande) mehrfach bestätigt wurde. Die Basenabfolge „CGGG“ tritt statistisch alle 256 bp auf. Somit hätten bei den RACE- Experimenten öfter solche Artefakte auftreten müssen, was nicht der Fall war.

4.4.5.2 5'- RACE an Genom- Transkripten

Die Transkriptionsstartpunkte sollten durch weitere 5'- RACE Experimente bestätigt werden. Diesmal wurde versucht, den Transkriptionsstartpunkt direkt am genomischen Transkript nachzuweisen. Hierfür wurde zuerst 5'- RACE READY cDNA aus 1 µg Human Fetal Brain polyA+ RNA hergestellt. Auch hier wurde einem Ansatz als Negativkontrolle keine Reverse Transkriptase zugegeben (-RT). Anschließend wurde eine PCR mit den Primern LTR12-F4 und dem Universalprimer, und dann eine Nested- PCR mit den Primern LTR12-F5 und dem Nested Universalprimer durchgeführt (Abb. 34).

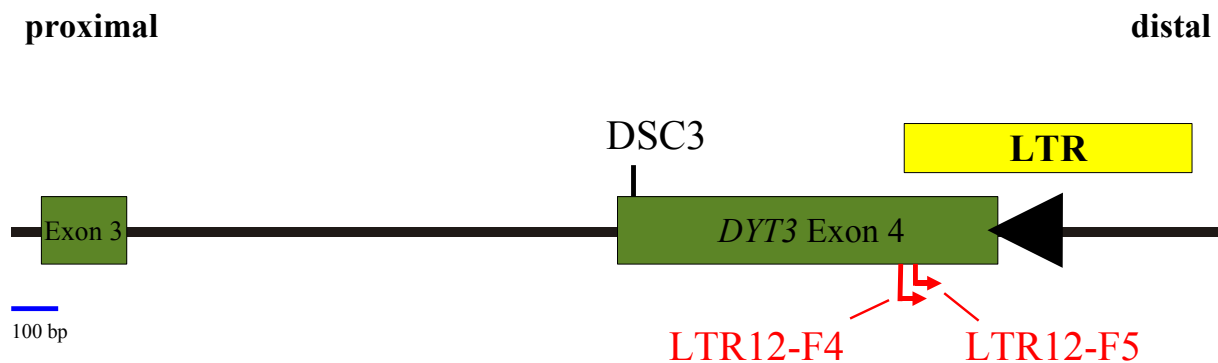


Abb. 34: Lokalisation der Primer für das LTR 5'-RACE. Dargestellt sind die für die RACE verwendeten Primer LTR12-F4 und LTR12-F5. Der LTR- Repeatbereich ist gelb dargestellt. Die Haupt- Transkriptionsrichtung des LTR- Promotors wird durch einen schwarzen Pfeil symbolisiert.

Dabei befindet sich der Primer für die erste Amplifikation (LTR12-F4) direkt vor dem LTR- Repeatbereich. Der Primer für die Nested- PCR (LTR12-F5) befindet sich im Repeatbereich. Nach der ersten PCR zeigte sich, dass die Amplifikation kein spezifisches PCR- Produkt ergeben hat. Es wurde nur ein „smear“ auf dem Gel sichtbar (Abb. 35a). Bei der Negativkontrolle zeigte sich nichts. Bei der Nested- PCR wurden mehrere Produkte amplifiziert. Aufgrund der, in den Luziferasevektor- RACE- Experimenten ermittelten Transkriptionsstartpunkte bei +1 und +42, wurden zwei Banden von 211 bp und 252 bp erwartet. Auf dem Gelfoto (Abb. 35b) erkennt man eine dominante Bande bei 210 bp. Zusätzlich tritt bei etwa 250 bp eine weitere Bande auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um die gesuchten RACE- Verlängerungen. Außerdem wurden drei weitere PCR- Produkte kleiner 200 bp amplifiziert.

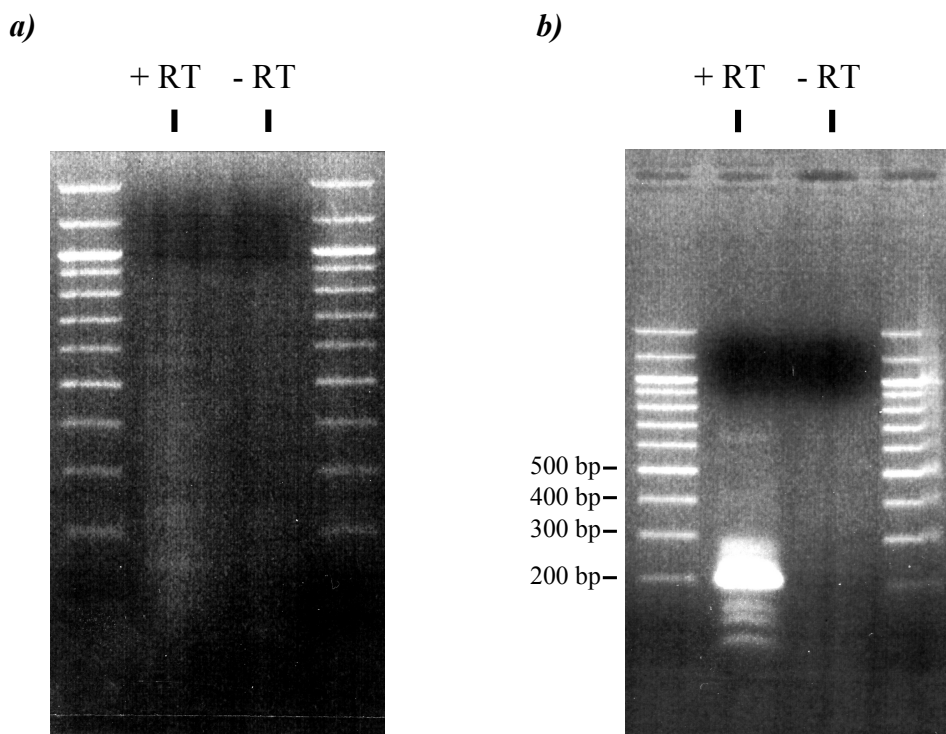


Abb. 35: LTR 5'- RACE Amplifikationen an genomischen Transkripten. Dargestellt sind die Ergebnisse der ersten Amplifikation mit LTR12-F4 (a), sowie der Nested- PCR mit LTR12-F5 (b). Zusätzlich zur RACE- Amplifikation (+RT) wurde eine Negativkontrolle mitgetestet (-RT). Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter verwendet.

Um den Transkriptionsstartpunkt bei +42 zu bestätigen, wurde die Bande bei 210 bp ausgeschnitten und in den Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO kloniert. Anschließend wurde sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei der 210 bp Bande um das gesuchte RACE- Produkt handelte (Abb. 36). Der Transkriptionsstartpunkt bei +42 konnte bestätigt werden.

```

ATCAGCACTC  TGTAAGTGG  ACCAATCAGC  AGGACATGGG  TGGGGACAAA  TAAGGGAAATA  AAAGCTGGCC  ACATTCCGCA
                                Spl-Motiv                                TATA-Box

      +1                                     +42
CCCCACCCACC  CACCCACCCA  CCAGGCCAGT  AGTAGCAACC  CACTCGGGTC  TCTTTCCACA  CCGTGGAAGC  TGTGTTCTTT
GTGCTGGAAT  TCGCCCTTAA  GCAGTGGTAT  CAACGCAGAG  TACGCGGGTC  TCTTTCCACA  CCGTGGAAGC  TGTGTTCTTT

CCGTCTTCAC  AATGAATCTT  GCTGCTGCTC  ACTCTTTGAG  TCCGTGCCAC  CTTTAAGAGC  TGTAACACTC  ACCGTGAAGG
CCGTCTTCAC  AATGAATCTT  GCTGCTGCTC  ACTCTTTGAG  TCCGTGCCAC  CTTTAAGAGC  TGTAACACTC  ACCGTGAAGG

TCCGTGGCTT  CATTCTTGAA  GTCAGCGAGA  CCAGGAACCC  ACCAAAAGGA  ACCAACTCCA  GAACCACCTC  CGGAGGGAGA
TCCGTGGCTT  CATTCTTGAA  GTCAGCGAGA  CCAGGAACCC  ACCAAAAGGA  ACCAACTCCA  GAACCACCTA  AGGGCGAATT

```

Abb. 36: Sequenzierung der 210 bp Bande. Dargestellt ist der Bereich um die Transkriptionsstartpunkte +1 und +42. Der für die Nested- PCR verwendete Primer LTR12-F5 ist rot gedruckt. Die durch die Sequenzierung der 210 bp Bande ermittelte Sequenz ist blau dargestellt. Die BD SMART II A Oligonukleotidsequenz ist gelb markiert. Sequenzen aus pCR 2.1-TOPO sind grau dargestellt.

4.5 Test auf Spleiß- Alterationen im Bereich *TAF1* Exon 18-19

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob die DSC 12 Mutation im *TAF1* Intron 18-19 das pre- mRNA Spleißen beeinflussen könnte. Der Bereich um DSC 12 entspricht einer putativen Branch- Site, die durch die DSC 12 Mutation zerstört würde. Es ist nicht auszuschließen, dass es in *TAF1* Intron 18-19 eine bislang unbekannte 3'- Splice Site gibt, die das Branch- Motiv um DSC 12 nutzt. Um dies zu überprüfen, wurde cDNA mit Hilfe von PCR amplifiziert. Zur Synthese der cDNA wurde RNA aus lymphoblastoiden Zellen, sowie aus foetalem Gehirn und Skelettmuskelgewebe verwendet. Die lymphoblastoiden Zellen stammen aus zwei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle 1+2), sowie aus zwei an XDP erkrankten Patienten (Patient 1+2). Die RNA der Patienten beinhaltet den DSC 12 T zu G Basenaustausch. Zur Amplifikation wurden die in Exon 18 und 19 lokalisierten Primer TAF_EX_18-F und TAF_EX_19-R verwendet (Abb. 37).

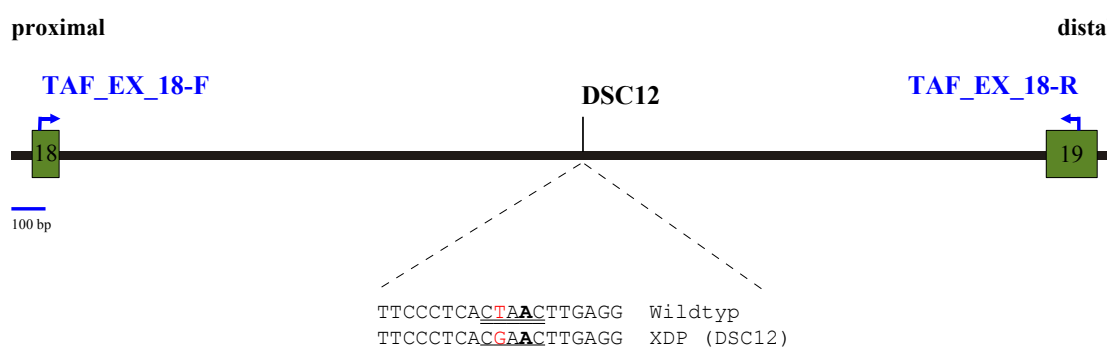


Abb. 37: DSC12 in *TAF1* Intron 18-19. Dargestellt ist der Bereich zwischen den *TAF1* Exonen 18 und 19. Der XDP spezifische T zu G Basenaustausch DSC12 befindet sich im Intron. Der Bereich um DSC 12 stellt ein putatives Branch- Site Motiv dar (doppelt unterstrichen).

Das PCR- Produkt sollte exakt 200 bp groß sein. Falls in Intron 18-19 eine bislang unbekannte Splice Acceptor Site existiert, so würde man zusätzlich ein größeres Produkt erwarten. Dieses sollte in den cDNAs der Patienten nicht nachzuweisen sein.

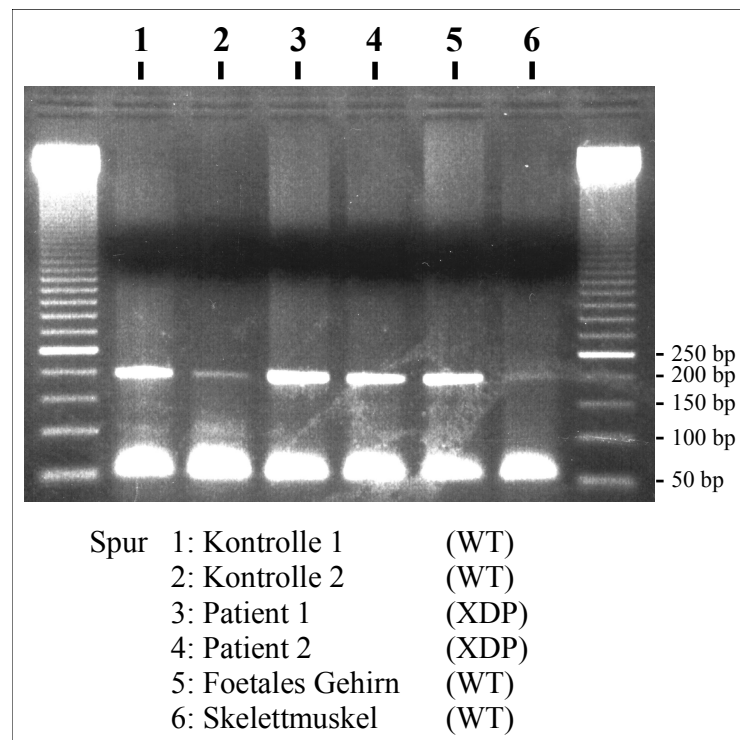


Abb. 38: Ergebnis der *TAF1* Exon 18-19 PCR. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der *TAF1* Exon 18-19 Amplifikationen mit cDNA aus Wildtyp- und Patienten- RNA. Als Größenstandard wurde eine 50 bp Leiter verwendet.

Die Auswertung des Gelfotos (Abb. 38) zeigte in allen Spuren die erwarteten Banden von 200 bp. Dies entspricht dem Abstand der Primer TAF_EX_18-F und TAF_EX_19-R. Bei den Amplifikationen mit cDNA aus „Kontrolle 2“- und „Skelettmuskel“- RNA wurde weniger Produkt gebildet. Außerdem sind in allen Spuren starke Primer- Banden bei etwa 50 bp zu erkennen. Davon abgesehen, gibt es neben den 200 bp Produkten keine weiteren Amplifikate und es lässt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und XDP cDNA feststellen.

5 Diskussion

Die Erforschung des X-chromosomalen Dystonie- Parkinson- Syndroms könnte einen wichtigen Beitrag im Bereich der Dystonie- Forschung leisten. Dadurch steigen die Chancen, dass verbesserte Therapieformen entwickelt werden. So könnte das Fortschreiten der Erkrankung aufgehalten oder zumindest verlangsamt werden und den Patienten ein qualvoller Tod erspart bleiben.

5.1 Die *DYT3* Transkriptvariante 3

Die Arbeiten von Nolte *et al.* [54] führten zu der Identifizierung neuer Exone im Bereich zwischen den Genen *TAF1* und *OGT*. Desweiteren wurden im *TAF1* Intronbereich neue Exone entdeckt, die bei der Analyse des *TAF1*- Gens bislang nicht beschrieben wurden. Die neu entdeckten Exone bilden ein Transkriptsystem, mit vier Hauptvarianten (Varianten 1-4) und mehreren Untervarianten (Varianten 2a-e) (siehe Abb. 3). Dabei umfassen Variante 1 und 2 auch originäre *TAF1*- Exone. Die Varianten 3 und 4 beschränken sich auf die *DYT3* Exone 1 bis 5, welche keine bekannten *TAF1* Exone einschließen.

Die Identifizierung des Transkriptsystems erfolgte mit Hilfe von RT- PCR und Phagenbank-Screenings. Zur 5'- Verlängerung der Klone wurden RT- PCR Amplifikationen durchgeführt. Die hierfür verwendeten Rückwärts- Primer befanden sich in den Exonen 3 und 4 und die Vorwärtsprimer in verschiedenen *TAF1* Exonen. So konnten die Transkriptvarianten 2 und 4 in 5'- Richtung verlängert, und die Untervarianten 2a-e identifiziert werden. Allerdings erhält man so nur Teile des Gesamt- Transkriptes, nämlich genau den Teil, der sich zwischen den verwendeten Primern befindet. Außerdem werden nur Transkripte erfasst, die auch *TAF1* Exone beinhalten. Die Transkriptvariante 3 konnte nicht verlängert werden, was darauf hindeuten könnte, dass es sich hier um ein *TAF1* unabhängiges Transkript handelt.

Um dies zu überprüfen, wurden 5'- RACE Experimente durchgeführt (siehe 4.1.1, S. 54). Exon 2 konnte um 312 bp in 5'- Richtung verlängert werden. Wie bereits in der Einleitung besprochen, besitzen viele Promotoren ein Sequenzelement, welches den Transkriptionsstartpunkt festlegt. Dieses Element wird Inr genannt. Die Inr- Konsensussequenz lautet PyPyA₊₁N(T/A)PyPy. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich bei A₊₁ [133]. Die Sequenz am 5'- Endes des Variante 3 Transkriptes lautet „TTACACT“. Das RACE- Produkt endet mit „ACACT“, d.h die erste Base des Transkriptes ist ein Adenin. Die Sequenz entspricht damit einer Inr- Konsensussequenz. Der durch

die RACE ermittelte Transkriptionsstartpunkt befindet sich exakt bei A₊₁. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der 312 bp Exon 2- Verlängerung um die maximale Verlängerung handelt und die Transkription an einem funktionalen Inr initiiert wird.

Zur Absicherung wurde mit Hilfe von PCR- Amplifikationen überprüft, ob weitergehende Exon 2 Verlängerungen vorhanden sein könnten (siehe 4.1.2, S. 58). Die Ex2V3-F3/Ex2V3-R2 Amplifikationen konnten zeigen, dass in diesem Bereich ein Transkript vorhanden ist und somit die durch die RACE ermittelte Verlängerung von Exon 2 bestätigen (Abb. 12). Bei der Amplifikation mit der Primerkombination Ex2V3-F4 und Ex2V3-R2 wurde nur bei der Amplifikation von genomischer DNA ein Produkt mit der dem Abstand der Primer entsprechenden Größe von knapp 500 bp amplifiziert. In den +RT und -RT Spuren wurde kein solches Produkt gebildet. Dies zeigt, dass es im Bereich des Primers Ex2V3-F4 kein Transkript gibt. Es kann damit ausgeschlossen werden, dass es über diesen Primer hinausgehende Exon 2 Verlängerungen gibt.

Bei der Amplifikation von genomischer DNA war neben dem 500 bp Produkt eine 250 bp Artefaktbande sichtbar. Diese fand sich auch in der +RT Spur. Zusätzlich trat ein Hintergrundsmear auf, der auf unspezifische Primerbindung hindeutet. Bei der 250 bp Bande in der +RT Spur handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine *DYT3* Spleißvariante, da diese 250 bp Bande auch in der genomischen Spur beobachtet wurde und hier eine gespleißte PCR- Matrize auszuschließen ist. Vielmehr scheint es sich um eine unspezifische Amplifikation gehandelt zu haben. Vor dem ermittelten Transkriptionsstartpunkt und damit im Bereich des Primers Ex2V3-F4 befindet sich ein AluY Repeat. So hat Ex2V3-F4 vermutlich auch an vielen anderen Alu Elementen gebunden und so den "smear" in der PCR hervorgerufen. Auf diese Weise könnte auch die 250 bp Bande entstanden sein.

5.1.1 Der Variante 3 Promotor

Die Ergebnisse der RACE- Experimente konnten zeigen, dass die Transkription der Variante 3 vor dem *DYT3* Exon 2 initiiert wird. Es wurde deshalb vermutet, dass in diesem Bereich ein funktionaler Promotor vorhanden sein muss.

Bei genauerer Analyse der Sequenz im Bereich des Transkriptionsstartpunktes konnte neben dem bereits beschriebenen Inr Element ein putatives BRE (TFIIB Recognition Element) an der Position -43 bis -37 (CCGCGCC) identifiziert werden, das sich jedoch verglichen mit der Literatur fünf Nukleotide weiter stromaufwärts befindet [134]. Die BRE Konsensussequenz lautet

(G/C)(G/C)(G/A)CGCC. Zur Funktion eines BRE ist bekannt, dass der basale Transkriptionsfaktor TFIIB an dieses Sequenzelement binden kann. Diese Interaktion kann aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken [134,135].

Neben Inr und putativem BRE findet sich kein weiteres Core- Promotor Element. Eine TATA- Box konnte nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass die TFIIB- BRE Interaktion entscheidend für die Bildung des Pre- Initiierungskomplexes bei TATA- Box losen Promotoren ist [136].

Neben den identifizierten Core- Promotor Konsensusmotiven wurde in der Region proximal Exon 2 eine CpG- Insel sowie ein Alu Repeat identifiziert. Eine Methylierung von Nukleotiden kann im Säuger- Genom ausschließlich am C-5- Atom eines Cytosins, und auch nur wenn dem Cytosin ein Guanosin folgt, stattfinden [137]. Das CpG Dinukleotid ist im Genom statistisch unterrepräsentiert. Dies liegt an der spontanen, hydrolytischen Deaminierung von 5-Methylcytosinen, die dadurch in Thymin umgewandelt werden. Eine Deaminierung von unmethyliertem Cytosin führt zur Bildung von Uracil, welches im Gegensatz zu Thymin von der Reparaturmaschinerie erkannt, und durch das ursprüngliche Cytosin ersetzt wird [138]. Bereiche, an denen die Häufigkeit des CpG Dinukleotids annähernd der statistischen Erwartung entspricht, nennt man CpG- Inseln [139]. Die Häufigkeit solcher CpG- Inseln im Genom beträgt etwa 1%.

Interessanterweise enthalten viele Promotoren CpG- Inseln und Alu Elemente [137,138]. Dies verstärkt die Vermutung, dass die Transkriptvariante 3 von einem eigenständigen Promotor getrieben wird.

Zur experimentellen Bestätigung wurden verschieden lange, putative Promotor- Fragmente auf transkriptions- stimulierende Aktivität hin untersucht (siehe 4.2, S. 60). Die Fragmente wurden in Luziferase- Vektoren kloniert und in Zellen der humanen Zelllinien NT2/D1 und U87 transfiziert. NT2/D1 Zellen sind pluripotent und wurden aus einem Embryonalkarzinom (Testis) isoliert. U87 hingegen entstammen einem Gehirntumor (Glioblastom/Astrozytom). Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, um die Messungen in einem neuronal- (U87) bzw. embryonal- (NT2/D1) ähnlichen Zellsystem durchführen zu können.

Die Promotoraktivität wurde durch Bestimmung der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten ermittelt. Dabei lag die Aktivität des längsten Fragmentes (639 bp) in beiden Zelllinien etwa vierfach über Hintergrund. Die beiden kürzeren Fragmente zeigten, mit Ausnahme des 137 bp Fragmentes in NT2/D1, keine transkriptionsstimulierende Aktivität. Das invers- orientierte 639 bp Fragment führte zu einer Luziferaseaktivität, deutlich niedriger als der Hintergrund (die basal- Aktivität des promotorlosen Vektors). Dies zeigt, dass vor Exon 2 ein funktionaler Promotor vorhanden ist und dieser die Expression der Transkriptvariante 3 reguliert. Dabei ist der Bereich zwischen dem 5'- Ende des 639 bp Fragmentes und dem 5'- Ende des 253 bp Fragmentes für die Aktivität essentiell.

Die Stärke des Promotors lässt sich aus diesen Experimenten jedoch nur bedingt ableiten. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch Vergleich der Luziferase- Vektoren mit Promotor-Fragment im Bezug zu dem promotorlosen Vektor pGL3-Basic. Die pGL3-Basic Zelllysate zeigten Luziferaseaktivitäten von einigen tausend RLU/s (relative light units pro Sekunde) bei NT2/D1 bis zu mehreren zehntausend RLU/s bei U87 Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Luziferaseaktivität untransfizierter Zellen lag jedoch nur bei etwa 20-30 RLU/s. Dies zeigt, dass der promotorlose Vektor eine je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägte, basale transkriptionsstimulierende Aktivität besitzt. Dies liegt vermutlich an im Vektor- Gerüst zufällig vorhandenen Konsensusmotiven, die unter Umständen transkriptionsstimulierend wirken können.

Der Unterschied zwischen promotorhaltigem und promotorlosem Vektor von etwa vier ist nicht ungewöhnlich niedrig. Wie zahlreiche Beispiele aus der Literatur zeigen, gibt es viele Promotoren bei denen der Unterschied ähnlich gering ausfällt. Bei den humanen DC-SIGN und DC-SIGNR Promotoren z.B. liegt die Aktivität je nach Zelllinie in einem Bereich zwischen 3- und 12- fach über dem Hintergrund [140]. Bei Untersuchungen am Promotor des humanen Retinoid Rezeptor α - Gens zeigte sich eine Aktivität etwa sechsfach über dem Hintergrund [141].

Es gibt jedoch auch viele Promotoren mit weitaus höherer Aktivität. So liegt die Aktivität des „Promotor F“ des humanen Östrogen- Rezeptor α - Gens in MG-63 Zellen etwa 25- fach über dem Hintergrund [142]. Eine noch höhere Aktivität (etwa 100- fach über Hintergrund) zeigte der Promotor des humanen „Ribonucleotid- Reduktase R2“ Gens [143].

Daraus lässt sich ableiten, dass es sich beim Promotor der Transkriptvariante 3 um einen (zumindest in den getesteten Zelllinien) relativ schwachen Promotor handelt.

5.1.2 Regulation des Promotors

BDP ist eine neurodegenerative Erkrankung, die Patienten erleiden einen Verlust striataler Neuronen. Andere Hirnregionen sind unauffällig (siehe Abschnitt 1.2.2). Außerdem handelt es sich um eine Krankheit, die sich erst im Erwachsenenalter manifestiert. Dies führt zu der Fragestellung, durch welche molekularen Regulationsmechanismen diese zeitlich und räumlich begrenzten Auswirkungen bedingt werden. Die Analyse der Regulation des krankheits- assoziierten Transkriptsystems *BDP3* könnte dabei helfen dies aufzudecken.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, wie der Promotor der Transkriptvariante 3 reguliert wird. Dabei sollten insbesondere Gehirn- relevante Regulationsmechanismen untersucht werden.

Aufgrund der in der Promotorregion identifizierten putativen Konsensusmotive (siehe 4.3.1, S. 63),

wurden die Transkriptionsfaktoren Ikaros, HIF-1 und MEF2 zur näheren Analyse ausgewählt. Die Konsensusmotive dieser Transkriptionsfaktoren sind relativ lang, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, tatsächlich funktionelle Motive identifiziert zu haben. Außerdem werden alle zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren im Gehirn exprimiert.

Um zu untersuchen, ob diese Transkriptionsfaktoren die Aktivität des Promotors beeinflussen, wurden Luziferaseassays durchgeführt. Es wurden Transkriptionsfaktor- überexprimierende Vektoren kotransfiziert, oder wie im Fall von HIF-1 die Zellen unter Hypoxie inkubiert.

5.1.2.1 Ikaros Koexpression

Das Ikaros- Gen wird alternativ gespleißt (Abb. 39) und codiert für mindestens sechs Ikaros Isoformen (Ik-1–Ik-6) [114,144,145]. Durch künstliche Deletion der Exone 3 und 4 wurden zwei weitere Ikaros Isoformen geschaffen (Ik-7, Ik-8).

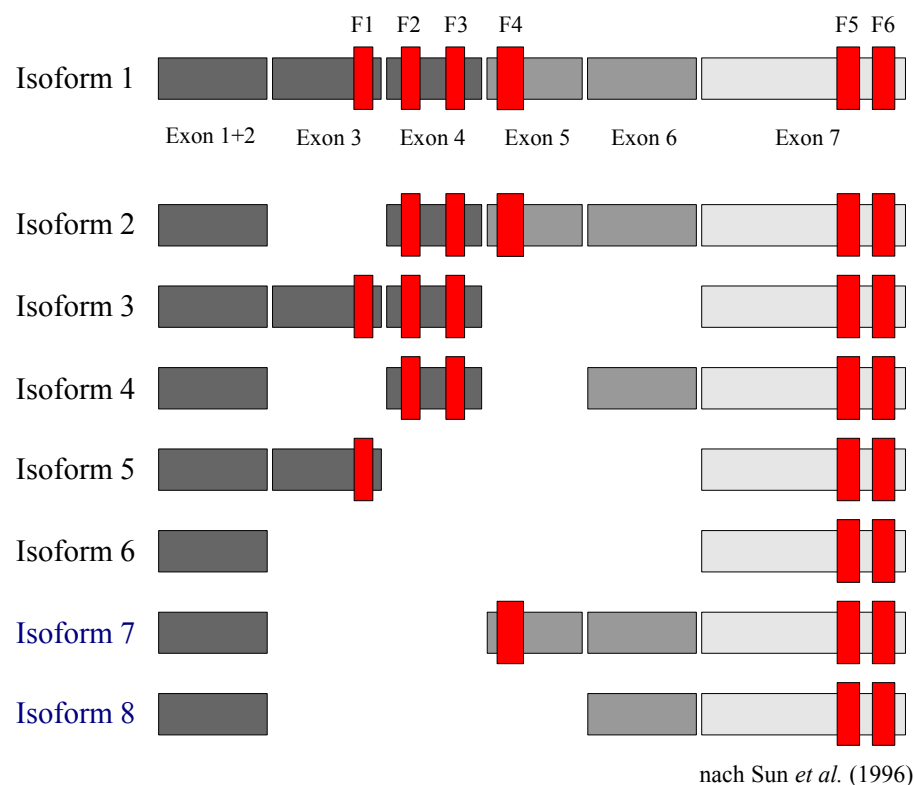


Abb. 39: Schematische Darstellung der Ikaros Isoformen. Die Zinkfinger (F1-F6) sind als rote Boxen dargestellt. Die N- terminalen Zinkfinger (F1-F4) dienen der Interaktion mit der DNA, während die C- terminalen Zinkfinger (F5,F6) für die Dimerbildung verantwortlich sind. Die künstlichen Ikaros Isoformen 7 und 8 sind blau dargestellt.

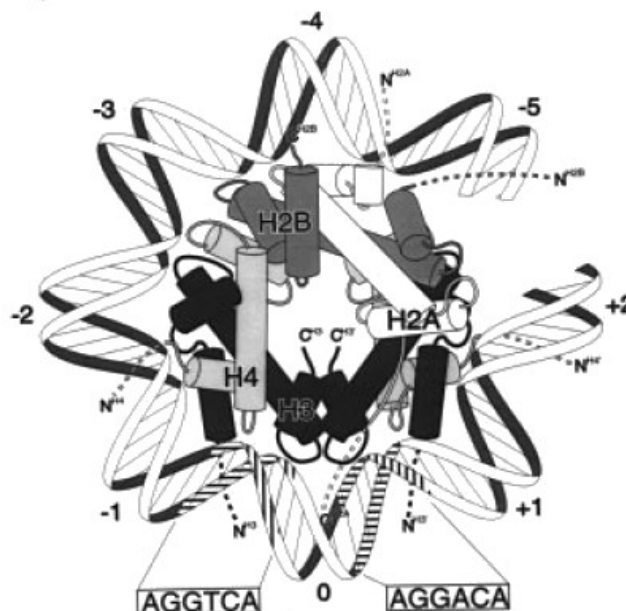
Für die Analyse von Ikaros (siehe 4.3.2, S. 63) wurden neben den Luziferase- Vektoren ein Ikaros Isoform 2 oder ein Ikaros Isoform 8 exprimierender Vektor kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde ein leerer Expressionsvektor kotransfiziert. Die Auswertung der Versuche zeigte, dass eine Überexpression der Ikaros Isoform 2 in beiden verwendeten Zelllinien (U87 und NT2/D1) eine Verringerung der Promotoraktivität bewirkte. Die Überexpression der Ikaros Isoform 8 führte hingegen zu einer Erhöhung der Promotoraktivität. Erklären lässt sich dieser gegensätzliche Effekt wie folgt.

Der Transkriptionsfaktor Ikaros bindet als Dimer an die DNA. Das Ikaros Monomer besitzt bis zu vier N- terminale und zwei C- terminale Zinkfinger. Dabei dienen die N- terminalen Zinkfinger (F1-F4) der Interaktion mit der DNA (also dem Konsensusmotiv), während die C- terminalen Zinkfinger (F5,F6) für die Dimerbildung verantwortlich sind [146,147]. Die Ikaros Isoform 2 besitzt beide C- terminalen und drei N- terminale Zinkfinger, während Isoform 8 nur die beiden C- terminalen Zinkfinger besitzt. Bei Überexpression von Isoform 8 kann diese ein Dimer mit endogen exprimierten Ikaros Monomeren bilden. Diese Dimere sind dann jedoch aufgrund der fehlenden N- terminalen Zinkfinger des Isoform 8- Monomers nicht in der Lage an die DNA zu binden [146]. So sinkt die Konzentration funktionaler Ikaros- Dimere im Zellkern. Dies erklärt den gegenteiligen Effekt bei Koexpression der Isoform 8. Bei Überexpression von Isoform 2 hingegen steigt die Konzentration funktionaler Dimere, was eine verstärkte Ikaros- Aktivität zur Folge hat.

Im Falle des Variante 3 Promotors bewirkt Ikaros eine Abschwächung der Transkription. Die reprimierende Wirkung von Ikaros ist bereits beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass Ikaros mit Corepressoren der Sin3 Familie interagiert und diese die Transkriptionshemmung durch Histon- Deacetylasen vermitteln [148,149]. Allerdings kann Ikaros auch transkriptions- aktivierend wirken [114,146]. Ob Ikaros aktivierend oder reprimierend wirkt, ist vom Promotor- Kontext sowie vom Zelltyp abhängig.

Die im Promotor der Transkriptvariante 3 an den Positionen -77/-64 und -1025/-1012 identifizierten putativen Bindemotive sind sogenannte Dualmotive. Das heißt, zwei Konsensusmotive liegen dicht beieinander und werden nur durch wenige Nukleotide getrennt. Im Falle des Variante 3 Promotors trennen die Konsensusmotive jeweils 13 bp, wobei sich die Sequenz zwischen den Motiven (die 13 bp) unterscheidet. Bereits zuvor wurde beschrieben, dass Ikaros an solche Dualmotive mit einer höheren Affinität als an Einzelmotive bindet [114]. Der Abstand der Motive von exakt 13 bp und die Tatsache, dass sich die Sequenz dazwischen unterscheidet, zeigt, dass die Dualmotive nicht durch eine Duplikation entstanden sein können. Dies lässt spekulieren, dass ein Abstand von 13 bp für die Erkennung wichtig ist. So könnte dies die Einzelmotive am Nukleosom aufgrund der helikalen Struktur der DNA in einem definierten Winkel zur „Oberfläche“ des Histons positionieren

und so die Erkennung durch den Transkriptionsfaktor verbessern (Abb. 40). Dieser Mechanismus wurde z.B. für das „thyroid hormone receptor response element“ (TRE) bereits beschrieben [150,151].



Wong *et al.* (1997)

Abb. 40: Positionierung des TRE am Nukleosom. Modellhaft dargestellt ist die um ein Nukleosom gewundene DNA Doppelhelix des TR β A Promotors. Die beiden Konsensusmotive des TRE (schraffierte Bereiche; AGGTCA/AGGACA) positionieren sich in definiertem Winkel zur Histon- „Oberfläche“.

Die Frage, ob alle im Promotorbereich identifizierten Ikaros Motive funktional sind, kann nicht beantwortet werden. Allerdings war der Ikaros- vermittelte Effekt auch bei Verwendung des kleineren 639 bp Promotor- Fragmentes nachweisbar (siehe Abb. 15, 16). Hier war die Reprimierung/Aktivierung jedoch weniger stark ausgeprägt, was darauf schließen lässt, dass mehrere Motive funktional sind.

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass der Promotor der Transkriptvariante 3 durch Ikaros reguliert wird. Ursprünglich beschrieben wurde dieser Transkriptionsfaktor als Regulator lymphozyten- spezifischer Gene der Maus [152]. Daher stammt auch die alternative Bezeichnung LyF-1 (lyphoid transcription factor). Ikaros ist für die Differenzierung von Lymphozyten essentiell und wurde in foetaler Leber und embryonalem Thymusgewebe nachgewiesen [145]. Zusätzlich konnte Ikaros jedoch auch im embryonalen Gehirn der Maus und des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nachgewiesen werden [153]. Die Expression im Gehirn beschränkte sich auf bilateral symmetrische

Bereiche im Corpus striatum.

Im Zusammenhang mit der Erforschung der Regulation des Enkephalin Gens, einem Neurotransmitter codierenden Gen, konnte nachgewiesen werden, dass die Ikaros- Expression im Gehirn zeitlich und räumlich gesteuert ist [154,155]. Sie beschränkt sich auf die subventrikuläre Zone und den sich entwickelnden Matrix- Bereich des Striatums (vgl. 1.2.2, S. 3). Im adulten Gehirn waren nur noch minimale Ikaros- Mengen nachweisbar (lediglich über PCR; nicht mehr über Northern Blots). Interessanterweise ist der Nucleus caudatus der Teil des Gehirns mit dem höchsten Anteil enkephalinerger Neuronen (etwa 80 %). Andere Gehirnregionen enthalten wesentlich weniger Neuronen dieses Typs.

5.1.2.2 Hypoxie Induktion

Sauerstoff ist für den Metabolismus aller Eukaryonten essentiell. So dient er z.B. als finaler Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette. Die Sauerstoffkonzentration muss exakt reguliert werden. Ein Zuviel an Sauerstoff muss ebenso wie eine zu geringe Sauerstoffkonzentration vermieden werden. Eine zu hohe Sauerstoffkonzentration würde die Bildung Reaktiver Sauerstoffpezies (ROS) begünstigen.

Die Regulation erfolgt einerseits über physiologische Prozesse, wie etwa die Atmungsregulation durch das Glomus caroticum. Andererseits beeinflusst die Sauerstoffkonzentration auch die Expression zahlreicher Gene. Einige dieser Gene werden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Hypoxie- regulierte Gene.

<i>Gen</i>	<i>Locus (homo sapiens)</i>
Adrenomedullin (ADM)	11p15.4
Häm- Oxygenase 1 (HO-1)	22q13.1
Erythropoietin (EPO)	7q22
Lactat Dehydrogenase A (LDHA)	11p15.4
Noxa (PMAIP1)	18q21.32
Phosphofructokinase L (PFKL)	21q22.3
Transferrin (TF)	3q22.1
vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	6p12

Erstmals näher untersucht wurde dieser Regulationsmechanismus bei der Analyse des Erythropoietin Gens [156]. Das Glycoprotein- Hormon Erythropoietin (EPO) steuert die Bildung von Erythrozyten und damit den Sauerstofftransport im Blut. Diese Arbeiten führten zur Entdeckung eines Sequenzelementes („Hypoxia Response Element“, HRE), welches die Expression des Erythropoietin Gens unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) stimuliert. Der für die Aktivierung verantwortliche Transkriptionsfaktor wurde HIF-1 („hypoxia-inducible factor-1“) genannt.

Heute kennt man über 70 Hypoxie- sensitive Gene, die durch HIF-1 reguliert werden [117]. Eines dieser Gene ist das Noxa- Gen, welches Hypoxie- induzierte Apoptose vermittelt [157]. Im Rahmen der Analyse des Noxa- Promotors wurde das für die Hypoxie- Sensitivität verantwortliche HRE des Noxa- Gens identifiziert und mit Hilfe von Gelshift- Analysen bestätigt.

Bei der Sequenzanalyse des *DYT3* Transkriptvariante 3 Promotorbereichs wurden zwei putative HRE identifiziert. Interessanterweise unterscheidet sich die Sequenz im Bereich des putativen HRE an Position -54 (ATTACAGG **CGTG** AGCCACCGCG) nur durch die letzte Base von dem, für die Noxa- Shift- Analysen verwendeten Oligonukleotid (ATTACAGG **CGTG** AGCCACCGCGT) (siehe 4.3.3, S. 66). Das HIF-1 Konsensusmotiv (fett gedruckt) befindet sich dabei mittig in diesem Oligonukleotid. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die letzte Base des Oligonukleotids (die auch nicht Teil der Konsensussequenz ist) für die HIF-1 Interaktion entscheidend ist. Es konnte deshalb mit einiger Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch das putative HRE im Transkriptvariante 3 Promotor an Position -54 HIF-1 binden kann.

Um zu überprüfen, ob der Variante 3 Promotor durch die Sauerstoffkonzentration reguliert wird, wurden Luziferaseassays angefertigt. Die für die Experimente verwendeten Vektoren enthielten entweder beide, nur eins oder gar keins der putativen HRE (Abb. 17). Dies sollte es ermöglichen zu unterscheiden, welches der Motive funktional ist. Als Positivkontrolle wurde ein Hypoxie-induzierbarer Luziferasevektor mitgetestet. Dieser zeigte in den Experimenten eine Steigerung der Luziferaseaktivität um etwa den Faktor vier (Abb. 18) und bestätigte somit, dass HIF-1 induziert wurde. Bei den Variante 3 Promotor- Vektoren war kein Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie feststellbar. Auch zwischen pGL3-Var3_639 und pGL3_639-TS, dem Vektor, dem der Transkriptionsstart- Bereich fehlt, war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Das heißt, das in pGL3-Var3_639-TS fehlende Inr hat keinen Einfluss auf die Stärke der Expression.

Es stellt sich die Frage, weshalb kein Hypoxie- induzierbarer Effekt messbar war, obwohl das HRE an Position -54 eine so große Ähnlichkeit zu dem im Noxa- Gen identifizierten HRE aufweist. Für die Aktivität eines Transkriptionsfaktors ist eine funktionale Konsensussequenz nötig. Damit der Faktor an die DNA binden kann, ist jedoch nicht nur die richtige Sequenz notwendig. Er muss auch Zugang zur DNA haben, was unter Umständen durch die strukturelle Organisation der DNA

verhindert wird [151].

Die unterste Organisationsstufe des Chromatins bilden die sogenannten Nukleosomen. Es handelt sich um einen Komplex aus acht Histon- Proteinen und etwa 146 bp DNA. Die DNA umschlingt dabei das Histon- Octamer für 1,75 Windungen bevor das nächste Nukleosom durch eine Linker- DNA von etwa 20 bp angeschlossen wird (nucleosomal gap) [151,158]. Die Linker- DNA ist nicht an Core Histon- Proteine gebunden.

Für die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren kommt es darauf an, wo das Konsensusmotiv lokalisiert ist. Einige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TFIIIA können effektiv an die DNA binden, wenn sich das Konsensusmotiv in einem Linker- Bereich befindet. Liegt das Motiv im Randbereich des Nukleosomen, so findet zumindest noch eine schwache Bindung statt. Im zentralen Nukleosomen- Bereich kann der Faktor nicht mehr binden [151]. Einige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TBP können per se gar nicht an nukleosomal organisierte DNA binden [159].

Im Fall der putativen HRE des Variante 3 Promotors stellt sich nun die Frage, inwieweit dies einen Einfluss auf die durchgeführten Versuche haben könnte.

Es ist bekannt, dass transfizierte Plasmid- DNA in sogenannten „Minichromosomen“ und damit nukleosomal organisiert ist [160]. So ist es vorstellbar, dass dies die Bindung von HIF-1 an die Luziferasevektoren verhindert hat. Es könnte also sein, dass der Promotor der Transkriptvariante 3 durch Hypoxie reguliert wird, diese Regulation jedoch von der Koaktivierung durch einen anderen, Histon- modifizierenden Transkriptionsfaktor abhängig ist. Erst durch diese Modifikation und die damit verbundene „Auflockerung“ der Chromatinstruktur kann HIF-1 an das/die HRE binden und die Transkription beeinflussen. Um dies zu überprüfen müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Bei einem ersten Experiment konnte kein koaktivierender Effekt durch Koexpression der Ikaros Isoform 8 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.2.3 MEF-2C Koexpression

MEF-2 (myocyte enhancer factor 2) Transkriptionsfaktoren werden hauptsächlich in Muskelgewebe, darüber hinaus jedoch auch im Gehirn exprimiert [161]. Bestimmte Isoformen des Faktors MEF-2C werden ausschließlich im Gehirn (im Cortex) exprimiert [162,163]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MEF-2 Transkriptionsfaktoren neuroprotektive Eigenschaften besitzen und während der Neurogenese antiapoptotisch wirken [164-166].

MEF-2C erkennt und bindet, wie die anderen MEF-2 Faktoren auch, die „MEF-2 site“ genannte Konsensussequenz C/TTA(A/T)₄TAG/A. Im Promotorbereich der Transkriptvariante 3 wurden an

den Positionen -17 und -498 solche Konsensusmotive identifiziert (siehe 4.3.4, S. 69).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ein MEF-2C überexprimierender Vektor die Aktivität der Luziferase- Promotorkonstrukte beeinflussen könnte.

Die Experimente zeigen, dass die Luziferaseaktivität bei MEF-2C Überexpression um etwa den Faktor zwei anstieg (Abb. 19a). Allerdings war eine Erhöhung der Luziferaseaktivität auch bei dem promotorlosen Vektor pGL3-Basic messbar. Hier sollte kein Effekt auftreten, da im Vektorbereich keine MEF-2 Konsensusmotive vorhanden sind. Daher ist davon auszugehen, dass der aktivierende Effekt bei MEF-2C Überexpression nicht auf eine Interaktion des Faktors mit einem Konsensusmotiv im Promotorbereich zurückzuführen ist. Diese Vermutung bestätigt sich, wenn man die Daten auf die jeweiligen pGL3-Basic Werte normalisiert (Abb. 19b). Hier verschwindet der aktivierende Effekt und es wird deutlich, dass die Aktivitätszunahme bei pGL3-Basic größer war als bei pGL3-Var3_1644.

5.2 Der LTR- Promotor distal Exon 4

Bei dem Vergleich der humanen und murinen Genome zwischen den Genen *TAF1* und *OGT* zeigte sich, dass der Bereich zwischen diesen Genen beim Menschen expandiert ist (Abb. 20). Außerdem sind im humanen Genom einige Sequenzen retroviralen Ursprungs (HERV- Fragmente, bzw. LTR) vorhanden. Auch konnte gezeigt werden, dass bei der Maus, im Gegensatz zum Schimpansen und Menschen, keine *DYT3* Exone vorhanden sind.

Dies zeigt, dass in diesem Bereich während der Evolution der Eutheria Insertionen stattgefunden haben. Verursacht wurden diese vermutlich durch retrovirale Transpositionen (Zunahme der Größe) und anschließender homologer Rekombination der LTR, was zur Entfernung der retroviralen Gene geführt hat (Abnahme der Größe). Übrig blieben einzelne LTR. Diese These wird dadurch gestützt, dass es sich bei den retroviralen Sequenzen im Bereich zwischen *TAF1* und *OGT* überwiegend um Fragmente einzelner LTR handelt. Dieses Zunahme/Abnahme- Modell wurde bereits ausführlich bei Pflanzen diskutiert [167]. Interessanterweise scheinen in das X- Chromosom überdurchschnittlich viele retrovirale Sequenzen inseriert zu sein, da hier die „human endogenous retrovirus“ (HERV)- Dichte nach der auf dem Y- Chromosom am zweithöchsten ist [168].

Es ist bekannt, dass die Regulation einiger Gene durch transponierbare Elemente beeinflusst wird [59,61]. Dabei kann das transponierbare Element als eigenständiger oder alternativer Promotor fungieren, ein Polyadenylierungssignal bereitstellen oder auch als Enhancer bzw. Silencer wirken

[62]. In Exon 4 des *DYT3* Transkriptsystems wurde ein solches Element identifiziert (Abb. 20). In anderen Exonen wurde kein solches Element gefunden. Da Exon 4 Teil aller Transkriptvarianten ist, könnte eine Regulation durch dieses transponierbare Element Auswirkungen auf das gesamte Transkriptsystem haben.

Bei genauerer Analyse zeigte sich, dass es sich bei dem Element um ein „long terminal repeat“ vom Typ LTR 12- handelt und dieses entgegengesetzt zum *DYT3* Transkriptsystem orientiert ist.

LTR12 gehören zu der endogenen Retrovirenfamilie HERV9. HERV9 (oder auch ERV9) werden als Klasse 1 endogene Retroviren klassifiziert und haben eine geschätzte Kopiezahl von 300 im haploiden Genom und zusätzlich etwa 5000 einzelne LTR [65]. Die stärkste HERV9 Expression wurde in Testis- und Nebennieren- Gewebe lokalisiert [169]. In anderen Geweben war der Expression deutlich geringer.

Bei der Sequenzanalyse des LTR 12 im Exon 4 Gegenstrang zeigte sich, dass dieses LTR Homologie zu einem von La Mantia *et al.* [131] und Strazzullo *et al.* [132] beschriebenen LTR 12 Promotor aufweist (siehe Abb. 22). Das für die Promotoraktivität essentielle SP1- Motiv, sowie die TATA- Box sind vorhanden. Die letzte Base des SP1- Motivs (TGGGTGGGGA) ist durch ein Adenosin ersetzt (TGGGTGGGGC bei La Mantia *et al.*). Inwieweit dies die Funktionalität des Promotors beeinflusst ist unbekannt. Allerdings handelt es sich auch bei La Mantia *et al.* um keine klassische GC Box (GGGGCGGGGC) und es wurde gezeigt, dass SP1 an ähnliche Motive binden kann und dort aktiv ist [170].

Die Experimente zur Ermittlung der Promotoraktivität (siehe 4.4.3.1, S. 74) konnten zeigen, dass das LTR 12 in Exon 4 Promotoraktivität besitzt. Die Aktivität des 521 bp LTR- Inserts lag bei NT2/D1 Zellen 47- fach über dem Hintergrund (siehe Abb. 24). Dies entspricht etwa der Aktivität eines SV 40 Promotors und ist sogar etwas höher als bei La Mantia *et al.* (39- fach über Hintergrund). Bei U87 Zellen war die Aktivität nur etwa halb so hoch.

Beim Vektor mit 162 bp Promotor- Insert (pGL3-LTR_162) war die Aktivität deutlich niedriger, vermutlich weil hier nicht mehr alle Repeats aus der U3- Region des LTR vorhanden sind (siehe Abb. 22). Bei pGL3-LTR_105 war keine Aktivität mehr messbar. In diesem Vektor sind ausschließlich das SP1- Motiv, sowie die TATA- Box, jedoch keine stromaufwärts gelegenen Repeatbereiche vorhanden. Diese scheinen für die Aktivität des Promotors essentiell zu sein.

Bei der Analyse des invers- orientierten Promotor- Fragmentes (pGL3-LTR_Neg) zeigte sich, dass es sich um einen bidirektionalen Promotor handelt. Die Aktivität dieses Fragmentes war, im Vergleich zu dem „normal“- orientierten Fragment nur halb so groß. Das heißt die stärkere Transkriptionsrichtung ist entgegengesetzt zur *DYT3* Transkriptionsrichtung. Dieses vom LTR- Promotor getriebene Transkript wäre komplementär zu Exon 4 und damit ein

Gegenstrangtranskript. Die Bidirektionalität des LTR- Promotors deckt sich mit Beispielen aus der Literatur, wo bereits mehrere solcher Promotoren beschrieben wurden. So konnten Dunn *et al.* zeigen, dass ein bidirektionaler ERV1 LTR- Promotor die Gene *DSCR4* und *DSCR8* transkribiert. Auch hier ist die Aktivität des Promotors in „sense“ Orientierung stärker als in „antisense“ Orientierung [171]. Auch die LTR der HERV-K Familie wurden bereits als bidirektionale Promotoren beschrieben [172].

5.2.1 Untersuchungen zur Enhanceraktivität

Es ist bekannt, dass LTR Elemente gewebespezifische Enhancer- Eigenschaften besitzen [128,173,174] und die Transkription naheliegender Gene beeinflussen können [175,176]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ERVs in der Nähe von Genen und in Introns statistisch unterrepräsentiert sind, vor allem wenn diese Gene in LTR- Transkriptionsrichtung lokalisiert sind [177,178]. Befindet sich ein LTR Element im 5' oder 3' UTR Bereich eines Gens, so weisen die meisten dieser LTR eine mit dem Gen identische Transkriptionsrichtung auf [179]. Daraus lässt sich folgern, dass LTR- Insertionen in der Nähe von Genen deren Funktion stören und somit evolutionär aussortiert wurden. Dies scheint insbesondere dann der Fall zu sein, wenn das LTR- Transkript zu dem Transkript des Gens gegenläufig ist, was im Falle des distal Exon 4 lokalisierten LTR Elementes zutrifft. Dieses LTR Element könnte die Regulation des *DYT3*- Gens beeinflussen weshalb untersucht wurde, ob das LTR Element Enhanceraktivität besitzt. Hierfür wurde zunächst eine Sequenzanalyse durchgeführt und das LTR Element distal Exon 4 mit einem von Ling *et al.* beschriebenen ERV9- LTR verglichen (LTR 12 ist ein ERV9- LTR).

Ling *et al.* konnten zeigen, dass der ERV9- LTR stromaufwärts der „DNase I hypersensitiven Region 5“ (HS5 site) des humanen β - Globin Locus eine zelltypspezifische Enhanceraktivität besitzt [180,181]. Die Aktivität beruht auf 14 Tandem- Repeats in der U3- Region, die Bindestellen für die Faktoren NF-Y (CCAAT), MZF1 (GTGGGA) und GATA-2 (TATC/GATA) enthalten [182].

Die U3- Region des LTR 12 im Exon 4 Gegenstrang ist im Vergleich zu dem von Ling *et al.* beschriebenen LTR anders aufgebaut. Hier finden sich neun repetitive Motive, die intern teilweise variable Basen enthalten (Abb. 22, blau dargestellt). In allen neun Repeats finden sich Bindemotive für NF-Y. Bindemotive für MZF1 und GATA-2 fehlen. Die Untersuchungen zum β - Globin LTR zeigten, dass die NF-Y Bindung das Grundgerüst für die anderen Faktoren darstellt und die anderen

Faktoren über Protein- Protein Interaktionen rekrutiert werden. Die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren durch NF-Y wurde auch in einem anderen Kontext beschrieben [183].

Bei der Suche nach weiteren möglichen Motiven in den U3- Repeats wurden putative F2F-Bindestellen (TAAAAT) identifiziert. Der Transkriptionsfaktor F2F wurde als Repressor des Prolactin- Promotors in nicht- Hypophysenzellen beschrieben [184].

Um eine mögliche Enhanceraktivität des Exon 4- LTR zu zeigen, wurde das 521 bp LTR- Fragment in beiden möglichen Orientierungen stromabwärts des Luziferasegens in die für Enhancer- Untersuchungen vorgesehene *SalI*- Schnittstelle kloniert (Abb. 25). Der Luziferasevektor enthielt entweder keinen Promotor (pGL3-Basic) oder das 639 bp Fragment des Variante 3 Promotors.

Nach Auswertung der Messungen zeigte sich in den Zelllinien U87 und NT2/D1 ein unterschiedliches Bild. Bei U87 hatte das LTR- Insert in sense- Orientierung keinen Effekt auf die Stärke der Transkription des Variante 3 Promotors. Bei antisense- Orientierung wurde eine Abnahme der Transkription auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes gemessen (Abb. 26). Dieser Effekt tritt jedoch auch bei dem promotorlosen Vektor auf.

Bei NT2/D1 Zellen führt das LTR- Insert in sense- Orientierung zu einer Erhöhung der Luziferaseaktivität auf etwa achtfach über Hintergrund. Dies gilt sowohl für den Vektor mit Variante 3 Promotor, als auch für den promotorlosen Vektor. Bei LTR- Insert in antisense- Orientierung kommt es beim Vektor mit Promotor zu einer Halbierung der Expressionsrate. Beim promotorlosen Vektor hingegen kommt es eher zu einer Erhöhung der Expressionsrate.

Die Aussage dieses Versuches ist nicht eindeutig. Zum einen unterscheiden sich die Ergebnisse je nach Zelltyp. Dies lässt auf eine zelltypspezifische Aktivität schließen. Zum anderen spielt die Orientierung des Enhancer- Inserts eine Rolle. Dies widerspricht der gängigen Definition eines Enhancers, der unabhängig von Ort- und Ausrichtung arbeitet. Allerdings findet man in der Literatur auch Beispiele für orientierungs- und zelltyp- spezifische Enhancer [185,186]. Möglicherweise gab es eine Interferenz zwischen den Luziferasetranskripten und den vom LTR- Fragment ausgehenden Gegenstrangtranskripten. Da das stromabwärts des Luziferase- Gens gelegene SV 40 Polyadenylierungssignal strangspezifisch ist, findet keine Termination von Gegenstrangtranskripten statt. LTR- getriebene Transkripte könnten also mit dem Luziferase- Transkriptbereich überlappen und so durch RNA Interferenz eine Abschwächung der Luziferaseaktivität zur Folge haben. Dies könnte umgangen werden, indem das LTR- Fragment an eine andere Position kloniert, oder ein Terminationssignal zwischengeschaltet wird. Außerdem wäre es sinnvoll das Experiment in einer Hypophysenzelllinie zu wiederholen, um eine mögliche Repression durch den Transkriptionsfaktor F2F zu umgehen.

5.2.2 In vivo Nachweis eines Exon 4 Gegenstrang- Transkripts

Die in Punkt 5.2 diskutierten Experimente haben gezeigt, dass es sich bei dem LTR 12 distal Exon 4 um einen funktionalen Promotor handelt. Es zeigte sich, dass die stärkere Aktivität entgegengesetzt zum *DYT3* Transkriptsystem orientiert ist. Da sich der Promotor am Ende des Exon 4 befindet, würde man ausgehend vom LTR- Promotor ein Exon 4 Gegenstrangtranskript erwarten. Die Bedeutung eukaryotischer Gegenstrangtranskripte wurde lange unterschätzt. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch die biologische Relevanz, indem vielfältige Funktionen im Bereich RNA Interferenz, Imprinting, Transkriptions- Inhibierung sowie Embryonalentwicklung nachgewiesen werden konnten [187,188]. Dies ist hinsichtlich der in Exon 4 lokalisierten XDP-spezifischen Mutation DSC3, aber auch hinsichtlich einer möglichen reziproken Regulation der Sense- und Antisense- Transkripte interessant.

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Northern- Blots versucht, das Exon 4 Gegenstrangtranskript nachzuweisen. Aufgrund der notwendigen Strangspezifität wurden als Sonden einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Mittels Blast- Analyse wurde eine Sonden- Homologie zu anderen Genombereichen ausgeschlossen. Der Exon 4 Bereich ist im Gegenstrang partiell homolog zum *SOCS6*- Gen (suppressor of cytokine signaling 6). Deshalb wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Sonden keine Ähnlichkeit zu diesem Gen aufweisen, um keine *SOCS6* Transkripte zu detektieren. Die Sonden wurden sequenziell hybridisiert, um falsch- positive Signale zu identifizieren. Zwischen den Hybridisierungen wurden die Blots gewaschen und probeexponiert, um sicherzugehen dass die alte Sonde vollständig entfernt wurde.

Die Analyse der Blots zeigte in den Skelettmuskel, Leber, Herz, sowie in allen Spuren des gehirnspezifischen Blots ein Signal bei etwa 1000 bp (Abb. 28a,b). Hier kann es sich nicht um *SOCS6*- Transkripte handeln, da diese mit 2,6 kbp deutlich größer sind.

Für die Experimente wurden bereits mehrfach benutzte Blots verwendet. Daher ist davon auszugehen, dass die Qualität der RNA auf den Blots nicht mehr optimal war. Dies zeigte sich auch bei der anschließenden Hybridisierung mit der Sonde LTR-Northern2. Die Signale waren nach dem erneuten „Strippen“ so schwach, dass eine druckreife Darstellung kaum möglich war. Bei dem Gehirn- spezifischen Blot waren die Signale nur noch mit bloßem Auge sichtbar.

Die β - Actin Normalisierung zeigte, dass in allen Spuren ähnlich viel RNA vorhanden war. Lediglich in der Gesamtgehirn- Spur des Mehrgewebs- Blots (Abb. 30a) war das Actin- Signal schwächer. Dies erklärt auch, weshalb in diesem Blot in der Gesamtgehirn- Spur kein Signal der LTR-Northern Sonde erkennbar war.

Die starken Actin- Signale oberhalb von 1,35 kbp in der Skelettmuskel und Herzspur sind auf das in

Muskelgewebe stark exprimierte α - Actin zurückzuführen. Die für die Hybridisierung verwendete Sonde ist zu 86 % mit α - Actin sequenzidentisch.

Die Daten bestätigen ein etwa 1000 bp großes Exon 4 Gegenstrangtranskript. Die stärkste Expression war in Skelettmuskel, Herz und Leber, sowie im gesamten Gehirn nachweisbar. Eine densitometrische Quantifizierung war aufgrund des schlechten Signal/ Hintergrund- Verhältnisses nicht möglich.

Die Größe des Transkriptes lässt sich aufgrund des PolyA- Schwanzes der mRNA nur ungefähr schätzen. Dieser kann bis zu mehreren hundert Nukleotiden lang sein. Allerdings überlappt das Transkript auf jeden Fall mit der in Exon 4 lokalisierten XDP- spezifischen Mutation DSC3, wie unabhängige Experimente mit einer DSC3- überlappenden Oligonukleotidsonde bestätigten (Daten von D. Nolte; nicht gezeigt).

5.2.3 Transkriptionsstartpunkte des Promotors

Der Transkriptionsstart befindet sich bei LTR Promotoren für gewöhnlich zwischen der R und U5- Region [79,189]. Die Transkriptionsstartpunkte des LTR 12 Promotors werden von einem Inr- Element und einer TATA- Box definiert [131,132]. Im von La Mantia *et al.* beschriebenen Promotor wurden zwei definierte Transkriptionsstartpunkte an den Positionen +1 und +5 identifiziert, wobei der Startpunkt bei +5 ein schwächeres Signal lieferte und vermutlich nicht so häufig genutzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass ein fehlendes oder mutiertes Inr die Position des Transkriptionsstartpunktes verschieben kann, jedoch keinen Einfluss auf die Stärke der Expression hat. Strazzullo *et al.* [132] haben gezeigt, dass bei mutiertem INR- Element ein weiter, stromabwärts gelegener Transkriptionsstartpunkt auftreten kann.

Zur Identifikation des/der Transkriptionsstartpunkte(s) des LTR 12 Promotors im *DYT3* Exon 4 Gegenstrang wurden 5'- RACE Experimente durchgeführt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Zum einen sollten die Startpunkte an Luziferasevektoren ermittelt werden. Dies hat den Vorteil, dass sich die für die RACE verwendeten Primer im Vektorbereich befinden können. Da es im humanen Genom keine Homologie zum verwendeten Vektor gibt, ist eine hohe Spezifität der RACE zu erwarten.

Zum anderen sollten die Startpunkte direkt im natürlichen Kontext gezeigt werden. Dies hat den Vorteil, dass so direkt bewiesen werden kann, dass das Exon 4 Gegenstrangtranskript vom LTR 12

Promotor distal Exon 4 getrieben wird. Leider ist hier aufgrund der Homologie des Transkriptes zum *SOCS6*- Gen und aufgrund der im Transkriptbereich lokalisierten U5- Region eine schlechte Spezifität der RACE- PCR zu erwarten.

Mit Hilfe der 5'- RACE am Luziferasevektor pGL3-LTR_552 (siehe 4.4.5.1, S. 83) konnten zwei Transkriptionsstartpunkte an den Position +1 und +42 identifiziert werden. Diese konnten in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden. Der Nachteil einer RACE (z.B. gegenüber einem Primer- Extension) ist allerdings, dass bei der RACE die Häufigkeit, mit der bestimmte Transkriptionsstartpunkte verwendet werden, nicht ermittelt werden kann. Die Stärke des PCR Signals gibt darüber keine Auskunft. So bleibt unbekannt, welcher der beiden ermittelten Transkriptionsstartpunkte häufiger genutzt wird.

Bei der 5'- RACE an Genom- Transkripten (siehe 4.4.5.2, S. 87) zeigte sich bereits in der ersten PCR (Abb. 35a) ein "smear", was auf eine schlechte Spezifität der PCR hindeutet. Dies setzt sich in der Nested- PCR fort (Abb. 35b). Hier zeigten sich mehrere unspezifische PCR- Produkte. Trotzdem wurden die beiden, den Transkriptionsstartpunkten entsprechenden Produkte (211 bp und 252 bp) mit hoher Effizienz amplifiziert. Dies beweist, dass das mit Hilfe der Northern Blot Experimente identifizierte Exon 4 Gegenstrangtranskript vom LTR- Promotor getrieben wird.

Die TATA- Box des Promotors befindet sich relativ zu +1 an Position -31 und die SP1- Box an Position -51 des hier beschriebenen LTR Promotors, was verglichen mit dem von La Mantia *et al.* veröffentlichtem Promotor eine Verschiebung um drei Nukleotide bedeutet.

5.3 Weitere Untersuchungen zu den *DYT3* Transkriptvarianten

Das Experiment zum Test auf Spleiß- Alterationen (siehe 4.5, S. 89) sollte zeigen, ob es im Bereich zwischen den *TAF1*- Exonen 18 und 19 bislang nicht beschriebene Spleiß- Varianten geben könnten. Der Bereich um DSC12 stellt eine putative Branch- Site dar. Die DSC12- Mutation zerstört jedoch das Konsensusmotiv. Dies könnte bei XDP- Patienten zu einem abnormalen Spleißen führen.

Das von Harris und Senapathy vorgeschlagene Branch- Site Konsensusmotiv lautet CT(A/G)A(C/T) [190]. Natürlich handelt es sich hierbei um ein sehr häufig vorkommendes Motiv. Es findet sich insgesamt 14 mal im Bereich zwischen Exon 18 und 19. Gegen ein bei DSC12 alternativ gespleißtes Transkript spricht, dass 20-50 bp stromabwärts von DSC12 keine putative Spleiß- Akzeptor Stelle identifiziert werden konnte. Trotzdem war die Durchführung des Experimentes sinnvoll, da ein alternatives Spleißen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann und der

Versuch mit geringem Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte.

Leider konnte kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und XDP- Zelllinien bzw. den Wildtyp- Geweben festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es keine weitere 3' Splice- Site vorhanden ist.

5.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten einige Fragen zum Aufbau und zur Regulation des *DYT3* Transkriptsystem klären. Damit verbunden ergeben sich jedoch wiederum neue Fragen.

Die Versuche zur Transkriptvariante 3 konnten den bekannten Transkriptbereich in 5'- Richtung verlängern und den Transkriptionsstartpunkt ermitteln. Auch die Regulation wurde untersucht. Offen bleibt jedoch die Funktion dieses Transkriptes. Durch die 5'- Verlängerung eröffnet sich die Möglichkeit, dass ein im verlängerten Bereich von Exon 2 beginnender Leserahmen proteincodierend sein könnte. Dieser Leserahmen umfasst 149 Aminosäuren und enthält ein putatives RNP-1 RNA- Bindemotiv (RGLGFLLL). Gegenwärtig wird versucht, das Protein in Lysaten aus verschiedenen Gehirnregionen nachzuweisen.

Die Experimente zeigten auch, dass es in Exon 4 ein DSC3- überlappendes Gegenstrangtranskript gibt. Dieses könnte proteincodierend sein. Im Exon 4 Gegenstrangtranskript gibt es zwei überlappende offene Leserahmen, wobei der erste Leserahmen nur 108 bp lang ist und mit einem Stop- Codon im zweiten Leserahmen endet. Der zweite Leserahmen umfasst 399 bp und schließt DSC3 ein. Die Mutation würde zu einem Arginin → Cystein Austausch führen. Allerdings ist es fraglich, ob dieser zweite Leserahmen proteincodierend ist, da das Startcodon des ersten Leserahmens in einem nach Kozak *et al.* stärkeren Initiierungs- Kontext steht [191].

Wie bereits in Abschnitt 5.2.2 erwähnt, ist der Exon 4 Gegenstrang teilweise homolog zum *SOCS6*- Gen. Betrachtet man die Leserahmen, so sind beide putativen Proteine partiell homolog zum N-terminalen Teil des *SOCS6*- Proteins. Dabei beträgt die Homologie des ersten Leserahmens 80 %. Beim Zweiten beträgt sie nur noch 47 %. Keiner der Leserahmen enthält Teile der SH2- oder *SOCS*- Domäne. Es scheint zweifelhaft, ob einem vom Exon 4 Gegenstrangtranskript codierten Protein, eine funktionelle Bedeutung zukommen würde.

Dem Gegenstrangtranskript könnte jedoch auf einem ganz anderen Gebiet eine funktionelle Bedeutung zukommen. Man schätzt, dass im humanen Genom mehr als 20 % aller Transkripte ein

natürliches Gegenstrangtranskript besitzen [192] und diese oftmals eine Rolle bei der Regulation durch RNA- Interferenz, Imprinting oder Transkriptionsinhibierung spielen [187,188]. Diese Arbeit hat gezeigt, dass es in Exon 4 ein natürliches, von einem LTR- Promotor getriebenes Gegenstrangtranskript gibt. Dieses Gegenstrangtranskript wird gewebespezifisch exprimiert. Alle bisher identifizierten *DYT3* Transkriptvarianten schließen Exon 4 ein.

Es ist vorstellbar, dass eine Regulation des *DYT3*- Transkriptsystems durch das LTR- Promotor getriebene Exon 4 Gegenstrangtranskript erfolgt. In einem nächsten Schritt sollte dieser putative Regulationsmechanismus experimentell untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Das X- chromosomale Dystonie- Parkinson- Syndrom (XDP) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit Auftreten der ersten Dystonie- Symptome im Erwachsenenalter. Die Patienten erleiden einen mosaikartigen Verlust neostriataler Neuronen verbunden mit einer Astrogliose. Im späteren Krankheitsverlauf ist das gesamte Neostriatum betroffen, oft einhergehend mit einer Parkinson- Symptomatik.

Der krankheits- assoziierte Locus befindet sich auf dem proximal- langen Arm des X- Chromosoms in Xq13.1. Im relevanten Genombereich konnten sieben patienten- spezifische SNPs, sowie eine 48 bp Deletion identifiziert werden. Außerdem wurde ein neues Transkriptsystem zwischen den Genen *TAF1* und *OGT* entdeckt, mit vier Haupt- Spleißvarianten und mehreren Untervarianten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, das Transkriptsystem näher zu charakterisieren. Dabei richtete sich das Hauptaugenmerk auf die Transkriptvariante 3.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptvariante einen eigenständigen, TATA- Box losen Promotor besitzt und die Transkription vor Exon 2 an einem Initiator- Element (Inr) initiiert wird. Das Transkript ist somit von *TAF1* Exonen unabhängig. Weitere Untersuchungen befassten sich mit der Regulation des Promotors. Es wurde in Transfektions- Experimenten die Aktivität des Promotors gezeigt und verschieden lange Promotor- Fragmente auf Aktivität hin untersucht. In Kotransfektions- Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Promotor durch den Transkriptionsfaktor Ikaros reprimiert wird. Dies ist hinsichtlich des Expressionsmusters dieses Transkriptionsfaktors interessant, da dieser im Gehirn ausschließlich während der Embryonalentwicklung und auch nur in einem beschränkten Areal des Striatums exprimiert wird. Eine Regulation des Transkriptvariante 3 Promotors durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1 und MEF-2C konnte nicht nachgewiesen werden.

In weiteren Untersuchungen wurde ein LTR- Element, welches teilweise mit Exon 4 überlappt näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen bidirektionalen Promotor handelt. Außerdem konnte eine schwache orientierungs- und zelltyp- abhängige Enhancer- bzw. Silenceraktivität des LTR gezeigt werden. Hier sind weitere Experimente in anderen Zelllinien nötig.

Desweiteren konnte ein etwa 1000 bp großes, gewebespezifisch- exprimiertes Exon 4 Gegenstrangtranskript nachgewiesen werden. Das Transkript wird von dem LTR- Promotor distal Exon 4 getrieben und an zwei definierten Transkriptionsstartpunkten initiiert. Das Gegenstrangtranskript überlappt die XDP spezifische Mutation DSC3.

In weiteren Experimenten wurde in lymphoblastoiden Wildtyp- und XDP- Zelllinien, sowie in Skelettmuskel- und foetalem Gehirngewebe nach Spleißvarianten im Bereich zwischen den *TAF1* Exonen 18 und 19 gesucht. Es konnte keine neue Spleißvariante entdeckt werden und es zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und XDP- Zelllinien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Verbindung zwischen der Regulation der Transkriptvariante 3 und der bei XDP betroffenen Gehirnregion.

Es erscheint sinnvoll, die Funktion sowie die Regulation der Transkriptvariante 3 aufzuklären. Möglicherweise ergeben sich so neue Erklärungsansätze zur Krankheitsentstehung unter Berücksichtigung der in Exon 4 lokalisierten Mutation DSC3.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Fahn, S; Bressman, S B; Marsden, C D. Classification of dystonia. *Advances In Neurology*. 78: 01.10.06 (1998)
- [2] Klein, C; Kann, M; Kis, B; Pramstaller, P P; Breakefield, X O; Ozelius, L J; Vieregge, P. [Genetics of dystonia] *Nervenarzt*. 71: 431-41 (2000)
- [3] Müller, U; Steinberger, D; Németh, A H. Clinical and molecular genetics of primary dystonias. *Neurogenetics*. 1: 165-77 (1998)
- [4] Müller, U; Kupke, K G. The genetics of primary torsion dystonia. *Hum. Gene. Ther.human Genetics*. 84: 107-15 (1990)
- [5] Németh, A H. The genetics of primary dystonias and related disorders. *Brain*. 125: 695-721 (2002)
- [6] Ichinose, H; Ohye, T; Takahashi, E; Seki, N; Hori, T; Segawa, M; Nomura, Y; Endo, K; Tanaka, H; Tsuji, S. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat. Cell Biol.nature Genetics*. 8: 236-42 (1994)
- [7] Bandmann, O; Nygaard, T G; Surtees, R; Marsden, C D; Wood, N W; Harding, A E. Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Hum. Immunol.human Molecular Genetics*. 5: 403-6 (1996)
- [8] Bandmann, O; Valente, E M; Holmans, P; Surtees, R A; Walters, J H; Wevers, R A; Marsden, C D; Wood, N W. Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. *Annals Of Neurology*. 44: 649-56 (1998)
- [9] Tassin, J; Dürr, A; Bonnet, A M; Gil, R; Vidailhet, M; Lücking, C B; Goas, J Y; Durif, F; Abada, M; Echenne, B; Motte, J; Lagueny, A; Lacomblez, L; Jedynak, P; Bartholomé, B; Agid, Y; Brice, A. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain*. : 1112-21 (2000)
- [10] Müller, U; Steinberger, D; Topka, H. Mutations of GCH1 in Dopa-responsive dystonia. *J. Nematol.journal Of Neural Transmission*. 109: 321-8 (2002)
- [11] Ozelius, L J; Hewett, J W; Page, C E; Bressman, S B; Kramer, P L; Shalish, C; De Leon, D; Brin, M F; Raymond, D; Corey, D P; Fahn, S; Risch, N J; Buckler, A J; Gusella, J F; Breakefield, X O. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat. Cell Biol.nature Genetics*. 17: 40-8 (1997)
- [12] Lee, L V; Pascasio, F M; Fuentes, F D; Viterbo, G H. Torsion dystonia in Panay, Philippines. *Advances In Neurology*. 14: 137-51 (1976)
- [13] Fahn, S; Moskowitz, C. X-linked recessive dystonia and parkinsonism in Filipino males. *Annals Of Neurology*. 24: 179 (1988)

-
- [14] Lee, L V; Kupke, K G; Caballar-Gonzaga, F; Hebron-Ortiz, M; Müller, U. The phenotype of the X-linked dystonia-parkinsonism syndrome. An assessment of 42 cases in the Philippines. *Medicine (Baltimore)*. 70: 179-87 (1991)
- [15] Evidente, V G H; Esteban, R P; Hernandez, J L; Natividad, F F; Advincula, J; Gwinn-Hardy, K; Hardy, J; Singleton, A; Singleton, A. Smell testing is abnormal in 'lubag' or X-linked dystonia-parkinsonism: a pilot study. *Parkinsonism Relat Disord*. 10: 407-10 (2004)
- [16] Lee, L V; Munoz, E L; Tan, K T; Reyes, M T. Sex linked recessive dystonia parkinsonism of Panay, Philippines (XDP). *Mol. Methods Plant Anal.molecular Pathology*. 54: 362-8 (2001)
- [17] Waters, C H; Faust, P L; Powers, J; Vinters, H; Moskowitz, C; Nygaard, T; Hunt, A L; Fahn, S. Neuropathology of lubag (x-linked dystonia parkinsonism). *Mov Disord*. 8: 387-90 (1993)
- [18] Altrocchi, P H; Forno, L S. Spontaneous oral-facial dyskinesia: neuropathology of a case. *Neurology*. 33: 802-5 (1983)
- [19] Vonsattel, J P; Myers, R H; Stevens, T J; Ferrante, R J; Bird, E D; Richardson, E P. Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*. 44: 559-77 (1985)
- [20] Albin, R L; Young, A B; Penney, J B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends In Neurosciences*. 12: 366-75 (1989)
- [21] Delong, M R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends In Neurosciences*. 13: 281-5 (1990)
- [22] Eidelberg, D; Takikawa, S; Wilhelmsen, K; Dhawan, V; Chaly, T; Robeson, W; Dahl, R; Margouleff, D; Greene, P; Hunt, A. Positron emission tomographic findings in Filipino X-linked dystonia-parkinsonism. *Annals Of Neurology*. 34: 185-91 (1993)
- [23] Waters, C H; Faust, P L; Powers, J; Vinters, H; Moskowitz, C; Nygaard, T; Hunt, A L; Fahn, S. Neuropathology of lubag (x-linked dystonia parkinsonism). *Mov Disord*. 8: 387-90 (1993)
- [24] Graybiel, A M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends In Neurosciences*. 13: 244-54 (1990)
- [25] Gerfen, C R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Microbiol.annual Review Of Neuroscience*. 15: 285-320 (1992)
- [26] Graybiel, A M; Canales, J J; Capper-Loup, C. Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends In Neurosciences*. 23: S71-7 (2000)
- [27] Goto, S; Lee, L V; Munoz, E L; Tooyama, I; Tamiya, G; Makino, S; Ando, S; Dantes, M B; Yamada, K; Matsumoto, S; Shimazu, H; Kuratsu, J; Hirano, A; Kaji, R. Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. *Annals Of Neurology*. 58: 01.07.17 (2005)

-
- [28] Kupke, K G; Lee, L V; Viterbo, G H; Arancillo, J; Donlon, T; Müller, U. X-linked recessive torsion dystonia in the Philippines. *Am. J. Med.american Journal Of Medical Genetics.* 36: 237-42 (1990)
- [29] Waters, C H; Takahashi, H; Wilhelmsen, K C; Shubin, R; Snow, B J; Nygaard, T G; Moskowitz, C B; Fahn, S; Calne, D B. Phenotypic expression of X-linked dystonia-parkinsonism (lubag) in two women. *Neurology.* 43: 1555-8 (1993)
- [30] Evidente, V G H; Nolte, D; Niemann, S; Advincula, J; Mayo, M C; Natividad, F F; Müller, U. Phenotypic and molecular analyses of X-linked dystonia-parkinsonism (Archives Of Neurology. 61: 1956-9 (2004)
- [31] Lee, L V; Munoz, E L; Tan, K T; Reyes, M T. Sex linked recessive dystonia parkinsonism of Panay, Philippines (XDP). *Mol. Methods Plant Anal.molecular Pathology.* 54: 362-8 (2001)
- [32] Plummer, C; Bradfield, J; Singleton, A B; Hernandez, D; Singleton, A A; O'sullivan, J. First case report of X linked dystonia parkinsonism (XDP) or 'lubag' in Australia. *J Clin Neurosci.* 12: 945-6 (2005)
- [33] Kupke, K G; Lee, L V; Müller, U. Assignment of the X-linked torsion dystonia gene to Xq21 by linkage analysis. *Neurology.* 40: 1438-42 (1990)
- [34] Wilhelmsen, K C; Weeks, D E; Nygaard, T G; Moskowitz, C B; Rosales, R L; Dela Paz, D C; Sobrevega, E E; Fahn, S; Gilliam, T C. Genetic mapping of Lubag (X-linked dystonia-parkinsonism) in a Filipino kindred to the pericentromeric region of the X chromosome. *Annals Of Neurology.* 29: 124-31 (1991)
- [35] Kupke, K G; Graeber, M B; Müller, U. Dystonia-parkinsonism syndrome (XDP) locus: flanking markers in Xq12-q21.1. *Am. J. Hum. Biol.american Journal Of Human Genetics.* 50: 808-15 (1992)
- [36] Graeber, M B; Müller, U. The X-linked dystonia-parkinsonism syndrome (XDP): clinical and molecular genetic analysis. *Brain Pathology.* 2: 287-95 (1992)
- [37] Graeber, M B; Kupke, K G; Müller, U. Delineation of the dystonia-parkinsonism syndrome locus in Xq13. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 89: 8245-8 (1992)
- [38] Müller, U; Haberhausen, G; Wagner, T; Fairweather, N D; Chelly, J; Monaco, A P. DXS106 and DXS559 flank the X-linked dystonia-parkinsonism syndrome locus (DYT3). *Genome Res.genomics.* 23: 114-7 (1994)
- [39] Haberhausen, G; Schmitt, I; Köhler, A; Peters, U; Rider, S; Chelly, J; Terwilliger, J D; Monaco, A P; Müller, U. Assignment of the dystonia-parkinsonism syndrome locus, DYT3, to a small region within a 1.8-Mb YAC contig of Xq13.1. *Am. J. Hum. Biol.american Journal Of Human Genetics.* 57: 644-50 (1995)

- [40] Németh, A H; Nolte, D; Dunne, E; Niemann, S; Kostrzewa, M; Peters, U; Fraser, E; Bochukova, E; Butler, R; Brown, J; Cox, R D; Levy, E R; Ropers, H H; Monaco, A P; Müller, U. Refined linkage disequilibrium and physical mapping of the gene locus for X-linked dystonia-parkinsonism (DYT3). *Genome Res.genomics*. 60: 320-9 (1999)
- [41] Van Der Maarel, S M; Scholten, I H; Huber, I; Philippe, C; Suijkerbuijk, R F; Gilgenkrantz, S; Kere, J; Cremers, F P; Ropers, H H. Cloning and characterization of DXS6673E, a candidate gene for X-linked mental retardation in Xq13.1. *Hum. Immunol.human Molecular Genetics*. 5: 887-97 (1996)
- [42] Smedley, D; Hamoudi, R; Lu, Y J; Cooper, C; Shipley, J. Cloning and mapping of members of the MYM family. *Genome Res.genomics*. 60: 244-7 (1999)
- [43] Shav-Tal, Y; Zipori, D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *Faseb J.febs Letters*. 531: 109-14 (2002)
- [44] Brancaccio, M; Guazzone, S; Menini, N; Sibona, E; Hirsch, E; De Andrea, M; Rocchi, M; Altruda, F; Tarone, G; Silengo, L. Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *Journal Of Biological Chemistry*. 274: 29282-8 (1999)
- [45] Martel, L S; Brown, H J; Berk, A J. Evidence that TAF-TATA box-binding protein interactions are required for activated transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 22: 2788-98 (2002)
- [46] Hilton, T L; Li, Y; Dunphy, E L; Wang, E H. TAF1 histone acetyltransferase activity in Sp1 activation of the cyclin D1 promoter. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 25: 4321-32 (2005)
- [47] Jäger, D; Stockert, E; Scanlan, M J; Güre, A O; Jäger, E; Knuth, A; Old, L J; Chen, Y T. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Research*. 59: 6197-204 (1999)
- [48] Gozani, O; Karuman, P; Jones, D R; Ivanov, D; Cha, J; Lugovskoy, A A; Baird, C L; Zhu, H; Field, S J; Lessnick, S L; Villasenor, J; Mehrotra, B; Chen, J; Rao, V R; Brugge, J S; Ferguson, C G; Payraastre, B; Myszka, D G; Cantley, L C; Wagner, G; Divecha, N; Prestwich, G D; Yuan, J. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*. 114: 99-111 (2003)
- [49] Nolte, D; Müller, U. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mammalian Genome*. 13: 62-4 (2002)
- [50] Nolte, D; Ramser, J; Niemann, S; Lehrach, H; Sudbrak, R; Müller, U. ACRC codes for a novel nuclear protein with unusual acidic repeat tract and maps to DYT3 (dystonia parkinsonism) critical interval in xq13.1. *Neurogenetics*. 3: 207-13 (2001)
- [51] Marchese, A; Heiber, M; Nguyen, T; Heng, H H; Saldivia, V R; Cheng, R; Murphy, P M; Tsui, L C; Shi, X; Gregor, P. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genome Res.genomics*. 29: 335-44 (1995)

-
- [52] Ponting, Chris P. Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research.* 30: 3643-52 (2002)
- [53] Peters, U; Haberhausen, G; Kostrzewa, M; Nolte, D; Müller, U. AFX1 and p54nrb: fine mapping, genomic structure, and exclusion as candidate genes of X-linked dystonia parkinsonism. *Hum. Gene. Ther.human Genetics.* 100: 569-72 ;| (1997)
- [54] Nolte, D; Niemann, S; Müller, U. Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 100: 10347-52 (2003)
- [55] Masuhara, M; Sakamoto, H; Matsumoto, A; Suzuki, R; Yasukawa, H; Mitsui, K; Wakioka, T; Tanimura, S; Sasaki, A; Misawa, H; Yokouchi, M; Ohtsubo, M; Yoshimura, A. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biocellbiochemical And Biophysical Research Communications.* 239: 439-46 (1997)
- [56] International Human Genome Sequencing Consortium,. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431: 931-45 (2004)
- [57] Blattner, F R; Plunkett, G; Bloch, C A; Perna, N T; Burland, V; Riley, M; Collado-Vides, J; Glasner, J D; Rode, C K; Mayhew, G F; Gregor, J; Davis, N W; Kirkpatrick, H A; Goeden, M A; Rose, D J; Mau, B; Shao, Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Sci. Total Environ.science.* 277: 1453-74 (1997)
- [58] Deininger, P L; Batzer, M A. Mammalian retroelements. *Genomegenome Research.* 12: 1455-65 (2002)
- [59] Van De Lagemaat, L N; Landry, J-R; Mager, D L; Medstrand, P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends In Genetics.* 19: 530-6 (2003)
- [60] Jordan, I K; Rogozin, I B; Glazko, G V; Koonin, E V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends In Genetics.* 19: 68-72 (2003)
- [61] Medstrand, P; Van De Lagemaat, L N; Dunn, C A; Landry, J-R; Svenback, D; Mager, D L. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res.* 110: 342-52 (2005)
- [62] Brosius, J. Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. *Genetica.* 107: 209-38 (1999)
- [63] Dewannieux, M; Heidmann, T. LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res.* 110: 35-48 (2005)
- [64] Bannert, N; Kurth, R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* : 14572-9 (2004)
- [65] Mager, D L; Medstrand, P. Retroviral repeat sequences. *Nature Encyclopedia of the Human Genome.* 5: 57-63 (2003)

-
- [66] Bieda, K; Hoffmann, A; Boller, K. Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *Journal Of General Virology*. 82: 591-6 (2001)
- [67] Mi, S; Lee, X; Li, X; Veldman, G M; Finnerty, H; Racie, L; Lavallie, E; Tang, X Y; Edouard, P; Howes, S; Keith, J C; McCoy, J M. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 403: 785-9 (2000)
- [68] Knerr, I; Huppertz, B; Weigel, C; Dötsch, J; Wich, C; Schild, R L; Beckmann, M W; Rascher, W. Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Molecular Human Reproduction*. 10: 581-8 (2004)
- [69] Casjens, S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology*. 49: 277-300 (2003)
- [70] Smit, A F. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 21: 1863-72 (1993)
- [71] Bénit, L; Lallemand, J B; Casella, J F; Philippe, H; Heidmann, T. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *Journal Of Virology*. 73: 3301-8 (1999)
- [72] Feuchter, A; Mager, D. Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 18: 1261-70 (1990)
- [73] Schön, U; Seifarth, W; Baust, C; Hohenadl, C; Erfle, V; Leib-Mösch, C. Cell type-specific expression and promoter activity of human endogenous retroviral long terminal repeats. *Virology*. 279: 280-91 (2001)
- [74] Wilhelm, M; Wilhelm, F X. Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cellular And Molecular Life Science*. 58: 1246-62 (2001)
- [75] Di Cristofano, A; Strazullo, M; Longo, L; La Mantia, G. Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 23: 2823-30 (1995)
- [76] Medstrand, P; Landry, J R; Mager, D L. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *Journal Of Biological Chemistry*. 276: 1896-903 (2001)
- [77] Landry, J-R; Rouhi, A; Medstrand, P; Mager, D L. The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol. Biol. Cellmolecular Biology And Evolution*. 19: 1934-42 (2002)
- [78] Kufe, D W; Pollock, R E; Weichselbaum, R R; Bast, R C; Gansler, T S; Holland, J F; James, F; Frei, E. *Cancer Medicine* 6th ed.. BC Decker Inc (2003)

-
- [79] Coffin, J M; Hughes, S H; Varmus, H E. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997)
- [80] Böhnlein, S; Hauber, J; Cullen, B R. Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Journal Of Virology*. 63: 421-4 (1989)
- [81] Hahn, S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*. 11: 394-403 (2004)
- [82] Smale, S T; Kadonaga, J T. The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review Of Biochemistry*. 72: 449-79 (2003)
- [83] Gross, P; Oelgeschläger, T. Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochem. Pharmacol. biochemical Society Symposia*. : 225-36 (2006)
- [84] Oelgeschläger, T; Chiang, C M; Roeder, R G. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature*. 382: 735-8 (1996)
- [85] Chalkley, G E; Verrijzer, C P. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo Journal*. 18: 4835-45 (1999)
- [86] Burke, T W; Kadonaga, J T. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes And Development*. 11: 3020-31 (1997)
- [87] Wang, W; Carey, M; Gralla, J D. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Sci. Total Environ. science*. 255: 450-3 (1992)
- [88] Holstege, F C; Van Der Vliet, P C; Timmers, H T. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo Journal*. 15: 1666-77 (1996)
- [89] Luse, D S; Jacob, G A. Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter. *Journal Of Biological Chemistry*. 262: 14990-7 (1987)
- [90] Holstege, F C; Fiedler, U; Timmers, H T. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo Journal*. 16: 7468-80 (1997)
- [91] Shilatifard, A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *Faseb Journal*. 12: 1437-46 (1998)
- [92] Narlikar, G J; Fan, H-Y; Kingston, R E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 108: 475-87 (2002)
- [93] Hampsey, M; Reinberg, D. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Neurol. Drugcurrent Opinion In Genetics & Development*. 9: 132-9 (1999)
- [94] Myers, L C; Kornberg, R D. Mediator of transcriptional regulation. *Annual Review Of Biochemistry*. 69: 729-49 (2000)

-
- [95] Woychik, N A; Hampsey, M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*. 108: 453-63 (2002)
- [96] Banerji, J; Rusconi, S; Schaffner, W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*. 27: 299-308 (1981)
- [97] Blackwood, E M; Kadonaga, J T. Going the distance: a current view of enhancer action. *Sci. Total Environ.* 281: 60-3 (1998)
- [98] Zhao, H; Dean, A. Organizing the genome: enhancers and insulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 516-24 (2005)
- [99] Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Garland Publishing (2002)
- [100] Szutorisz, H; Dillon, N; Tora, L. The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends In Biochemical Sciences*. 30: 593-9 (2005)
- [101] Li, Q; Peterson, K R; Fang, X; Stamatoyannopoulos, George. Locus control regions. *Blood*. 100: 3077-86 (2002)
- [102] Dean, A. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends In Genetics*. 22: 38-45 (2006)
- [103] Driscoll, M C; Dobkin, C S; Alter, B P. Gamma delta beta-thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' beta-globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 86: 7470-4 (1989)
- [104] Bulger, M; Groudine, M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes And Development*. 13: 2465-77 (1999)
- [105] Engel, J D; Tanimoto, K. Looping, linking, and chromatin activity: new insights into beta-globin locus regulation. *Cell*. 100: 499-502 (2000)
- [106] Milanini, J; Viñals, F; Pouyssegur, J; Pagès, G. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *Journal Of Biological Chemistry*. 273: 18165-72 (1998)
- [107] Mcdermott, J C; Cardoso, M C; Yu, Y T; Andres, V; Leifer, D; Krainc, D; Lipton, S A; Nadal-Ginard, B. hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Molecular And Cellular Biology*. 13: 2564-77 (1993)
- [108] Liu, M; Whetstine, J R; Payton, S G; Ge, Y; Flatley, R M; Matherly, L H. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochemical Journal*. 383: 249-57 (2004)
- [109] Zhu, Y Y; Machleder, E M; Chenchik, A; Li, R; Siebert, P D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*. 30: 892-7 (2001)

-
- [110] Groskreutz, D J; Sherf, B A; Wood, K V; Schenborn, E T. Increased Expression and Convenience with the New pGL3Luciferase Reporter Vectors. *Promega Notes Magazine*. 50: (1995)
- [111] Wood, K V. The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays *Promega Notes Magazine*. 65: (1998)
- [112] Matys, V; Fricke, E; Geffers, R; Gössling, E; Haubrock, M; Hehl, R; Hornischer, K; Karas, D; Kel, A E; Kel-Margoulis, O V; Kloos, D-U; Land, S; Lewicki-Potapov, B; Michael, H; Münch, R; Reuter, I; Rotert, S; Saxel, H; Scheer, M; Thiele, S; Wingender, E. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Research*. 31: 374-8 (2003)
- [113] Ghosh, D. Object-oriented transcription factors database (ooTFD). *Nucleic Acids Research*. 28: 308-10 (2000)
- [114] Molnár, A; Georgopoulos, K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biochem. molecular And Cellular Biology*. 14: 8292-303 (1994)
- [115] Nietfeld, W; Meyerhans, A. Cloning and sequencing of hIk-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse Ikaros/LyF-1. *Immunol. Investig. immunology Letters*. 49: 139-41 (1996)
- [116] Wang, G L; Jiang, B H; Rue, E A; Semenza, G L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 92: 5510-4 (1995)
- [117] Semenza, G L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 19: 176-82 (2004)
- [118] Kelly, B D; Hackett, S F; Hirota, K; Oshima, Y; Cai, Z; Berg-Dixon, S; Rowan, A; Yan, Z; Campochiaro, P A; Semenza, G L. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circulation Research*. 93: 1074-81 (2003)
- [119] Wenger, R H; Gassmann, M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Bull. Poznanbiological Chemistry*. 378: 609-16 (1997)
- [120] Kim, J-Y; Ahn, H-J; Ryu, J-H; Suk, K; Park, J-H. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Exp. Child Psychol. journal Of Experimetnal Medicine*. 199: 113-24 (2004)
- [121] Pollock, R; Treisman, R. Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes And Development*. 5: 2327-41 (1991)
- [122] Yu, Y T; Breitbart, R E; Smoot, L B; Lee, Y; Mahdavi, V; Nadal-Ginard, B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes And Development*. 6: 1783-98 (1992)

-
- [123] Breitbart, R E; Liang, C S; Smoot, L B; Laheru, D A; Mahdavi, V; Nadal-Ginard, B. A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development*. 118: 1095-106 (1993)
- [124] Martin, J F; Miano, J M; Hustad, C M; Copeland, N G; Jenkins, N A; Olson, E N. A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 14: 1647-56 (1994)
- [125] Leifer, D; Krainc, D; Yu, Y T; Mcdermott, J; Breitbart, R E; Heng, J; Neve, R L; Kosofsky, B; Nadal-Ginard, B; Lipton, S A. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 90: 1546-50 (1993)
- [126] Saadane, N; Alpert, L; Chalifour, L E. TAFII250, Egr-1, and D-type cyclin expression in mice and neonatal rat cardiomyocytes treated with doxorubicin. *American Journal Of Physiology*. 276: H803-14 (1999)
- [127] Shafi, R; Iyer, S P; Ellies, L G; O'donnell, N; Marek, K W; Chui, D; Hart, G W; Marth, J D. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 97: 5735-9 (2000)
- [128] Yu, X; Zhu, X; Pi, W; Ling, J; Ko, L; Takeda, Y; Tuan, D. The long terminal repeat (LTR) of ERV-9 human endogenous retrovirus binds to NF-Y in the assembly of an active LTR enhancer complex NF-Y/MZF1/GATA-2. *Journal Of Biological Chemistry*. 280: 35184-94 (2005)
- [129] Schramke, V; Allshire, R. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Sci. Total Environ.science*. 301: 1069-74 (2003)
- [130] Dunn, C A; Romanish, M T; Gutierrez, L E; Van De Lagemaat, L N; Mager, D L. Transcription of two human genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. *Gen. Physiol. Biophys.gene*. 366: 335-42 (2006)
- [131] La Mantia, G; Majello, B; Di Cristofano, A; Strazzullo, M; Minchiotti, G; Lania, L. Identification of regulatory elements within the minimal promoter region of the human endogenous ERV9 proviruses: accurate transcription initiation is controlled by an Inr-like element. *Nucleic Acids Research*. 20: 4129-36 (1992)
- [132] Strazzullo, M; Majello, B; Lania, L; La Mantia, G. Mutational analysis of the human endogenous ERV9 proviruses promoter region. *Virology*. 200: 686-95 (1994)
- [133] Lo, K; Smale, S T. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gen. Physiol. Biophys.gene*. 182: 13-22 (1996)
- [134] Lagrange, T; Kapanidis, A N; Tang, H; Reinberg, D; Ebright, R H. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes And Development*. 12: 34-44 (1998)

- [135] Evans, R; Fairley, J A; Roberts, S G. Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes And Development*. 15: 2945-9 (2001)
- [136] Weis, L; Reinberg, D. Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 17: 2973-84 (1997)
- [137] Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes And Development*. 16: 01.06.21 (2002)
- [138] Jones, P A; Baylin, S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. New Biol.nature Reviews Genetics*. 3: 415-28 (2002)
- [139] Caiafa, P; Zampieri, M. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *Journal Of Cellular Biochemistry*. 94: 257-65 (2005)
- [140] Liu, H; Yu, W; Liou, L Y; Rice, A P. Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gen. Physiol. Biophys.gene*. 313: 149-59 (2003)
- [141] Li, G; Yin, W; Chamberlain, R; Hewett-Emmett, D; Roberts, J N; Yang, X; Lippman, S M; Clifford, J L. Identification and characterization of the human retinoid X receptor alpha gene promoter. *Gen. Physiol. Biophys.gene*. 372: 118-27 (2006)
- [142] Lambertini, E; Penolazzi, L; Giordano, S; Del Senno, L; Piva, R. Expression of the human oestrogen receptor-alpha gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells. *Biochemical Journal*. 372: 831-9 (2003)
- [143] Park, J B; Levine, M. Characterization of the promoter of the human ribonucleotide reductase R2 gene. *Biocellbiochemical And Biophysical Research Communications*. 267: 651-7 (2000)
- [144] Hahm, K; Ernst, P; Lo, K; Kim, G S; Turck, C; Smale, S T. The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 14: 7111-23 (1994)
- [145] Georgopoulos, K; Moore, D D; Derfler, B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Sci. Total Environ.science*. 258: 808-12 (1992)
- [146] Sun, L; Liu, A; Georgopoulos, K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo Journal*. 15: 5358-69 (1996)
- [147] Mccarty, A S; Kleiger, G; Eisenberg, D; Smale, S T. Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol. Carcinog.molecular Cell*. 11: 459-70 (2003)
- [148] Koipally, J; Renold, A; Kim, J; Georgopoulos, K. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo Journal*. 18: 3090-100 (1999)

- [149] Liu, M; Whetstine, J R; Payton, S G; Ge, Y; Flatley, R M; Matherly, L H. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochemical Journal*. 383: 249-57 (2004)
- [150] Wong, J; Li, Q; Levi, B Z; Shi, Y B; Wolffe, A P. Structural and functional features of a specific nucleosome containing a recognition element for the thyroid hormone receptor. *Embo Journal*. 16: 7130-45 (1997)
- [151] Urnov, F D; Wolffe, A P. A necessary good: nuclear hormone receptors and their chromatin templates. *Mol. Ecol.molecular Endocrinology*. 15: 01.01.16 (2001)
- [152] Lo, K; Landau, N R; Smale, S T. LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 11: 5229-43 (1991)
- [153] Willett, C E; Kawasaki, H; Amemiya, C T; Lin, S; Steiner, L A. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development. *Dev. Brain Res.developmental Dynamics*. 222: 694-8 (2001)
- [154] Dobi, A; Palkovits, M; Ring, M A; Eitel, A; Palkovits, C G; Lim, F; Agoston, D V. Sample and probe: a novel approach for identifying development-specific cis-elements of the enkephalin gene. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 52: 98-111 (1997)
- [155] Agoston, D V; Dobi, A. Complexity of transcriptional control in neuropeptide gene expression; enkephalin gene regulation during neurodevelopment. *Biochem. Soc. Symp.biochemical Society Transactions*. 28: 446-51 (2000)
- [156] Semenza, G L; Wang, G L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 12: 5447-54 (1992)
- [157] Kim, J-Y; Ahn, H-J; Ryu, J-H; Suk, K; Park, J-H. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Exp. Child Psychol.journal Of Experimetnal Medicine*. 199: 113-24 (2004)
- [158] Strachan, T; Read, A P. *Human Molecular Genetics 2*. John Wiley & Sons, Inc. (1999)
- [159] Imbalzano, A N; Kwon, H; Green, M R; Kingston, R E. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature*. 370: 481-5 (1994)
- [160] Reeves, R; Gorman, C M; Howard, B. Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 13: 3599-615 (1985)
- [161] Yu, Y T; Breitbart, R E; Smoot, L B; Lee, Y; Mahdavi, V; Nadal-Ginard, B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes And Development*. 6: 1783-98 (1992)

- [162] Leifer, D; Krainc, D; Yu, Y T; Mcdermott, J; Breitbart, R E; Heng, J; Neve, R L; Kosofsky, B; Nadal-Ginard, B; Lipton, S A. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 90: 1546-50 (1993)
- [163] Mcdermott, J C; Cardoso, M C; Yu, Y T; Andres, V; Leifer, D; Krainc, D; Lipton, S A; Nadal-Ginard, B. hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Molecular And Cellular Biology*. 13: 2564-77 (1993)
- [164] Mao, Z; Bonni, A; Xia, F; Nadal-Vicens, M; Greenberg, M E. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Sci. Total Environ.science*. 286: 785-90 (1999)
- [165] Okamoto, S; Krainc, D; Sherman, K; Lipton, S A. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 97: 7561-6 (2000)
- [166] Gong, X; Tang, X; Wiedmann, M; Wang, X; Peng, J; Zheng, D; Blair, L A C; Marshall, J; Mao, Z. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron*. 38: 33-46 (2003)
- [167] Vitte, C; Panaud, O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Res*. 110: 91-107 (2005)
- [168] Kim, T-H; Jeon, Y-J; Yi, J-M; Kim, D-S; Huh, J-W; Hur, C-G; Kim, H-S. The distribution and expression of HERV families in the human genome. *Mol. Vis.molecules And Cells*. 18: 87-93 (2004)
- [169] Svensson, A C; Raudsepp, T; Larsson, C; Di Cristofano, A; Chowdhary, B; La Mantia, G; Rask, L; Andersson, G. Chromosomal distribution, localization and expression of the human endogenous retrovirus ERV9. *Cytogenetics And Cell Genetics*. 92: 89-96 (2001)
- [170] Letovsky, J; Dynan, W S. Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 17: 2639-53 (1989)
- [171] Dunn, C A; Romanish, M T; Gutierrez, L E; Van De Lagemaat, L N; Mager, D L. Transcription of two human genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. *Gen. Physiol. Biophys.gene*. 366: 335-42 (2006)
- [172] Domansky, A N; Kopantzev, E P; Snezhkov, E V; Lebedev, Y B; Leib-Mosch, C; Sverdlov, E D. Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *Faseb J.febs Letters*. 472: 191-5 (2000)
- [173] Ling, J; Pi, W; Bollag, R; Zeng, S; Keskinetepe, M; Saliman, H; Krantz, S; Whitney, B; Tuan, D. The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *Journal Of Virology*. 76: 2410-23 (2002)

- [174] Ruda, V M; Akopov, S B; Trubetskoy, D O; Manuylov, N L; Vetchinova, A S; Zavalova, L L; Nikolaev, L G; Sverdlov, E D. Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K(HML-2) LTR. *Virologyvirus Research*. 104: 11.06.06 (2004)
- [175] Medstrand, P; Van De Lagemaat, L N; Dunn, C A; Landry, J-R; Svenback, D; Mager, D L. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res*. 110: 342-52 (2005)
- [176] Peaston, A E; Evsikov, A V; Graber, J H; De Vries, W N; Holbrook, A E; Solter, D; Knowles, B B. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell*. 7: 597-606 (2004)
- [177] Smit, A F. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Neurol. Drugcurrent Opinion In Genetics & Development*. 9: 657-63 (1999)
- [178] Medstrand, P; Van De Lagemaat, L N; Mager, D L. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genomegenome Research*. 12: 1483-95 (2002)
- [179] Van De Lagemaat, L N; Landry, J-R; Mager, D L; Medstrand, P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends In Genetics*. 19: 530-6 (2003)
- [180] Ling, J; Pi, W; Bollag, R; Zeng, S; Keskinetepe, M; Saliman, H; Krantz, S; Whitney, B; Tuan, D. The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *Journal Of Virology*. 76: 2410-23 (2002)
- [181] Pi, W; Yang, Z; Wang, J; Ruan, L; Yu, X; Ling, J; Krantz, S; Isales, C; Conway, S J; Lin, S; Tuan, D. The LTR enhancer of ERV-9 human endogenous retrovirus is active in oocytes and progenitor cells in transgenic zebrafish and humans. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 101: 805-10 (2004)
- [182] Yu, X; Zhu, X; Pi, W; Ling, J; Ko, L; Takeda, Y; Tuan, D. The long terminal repeat (LTR) of ERV-9 human endogenous retrovirus binds to NF-Y in the assembly of an active LTR enhancer complex NF-Y/MZF1/GATA-2. *Journal Of Biological Chemistry*. 280: 35184-94 (2005)
- [183] Wright, K L; Vilen, B J; Itoh-Lindstrom, Y; Moore, T L; Li, G; Criscitiello, M; Cogswell, P; Clarke, J B; Ting, J P. CCAAT box binding protein NF-Y facilitates in vivo recruitment of upstream DNA binding transcription factors. *Embo Journal*. 13: 4042-53 (1994)
- [184] Jackson, S M; Keech, C A; Williamson, D J; Gutierrez-Hartmann, A. Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol. Cell. Biochem.molecular And Cellular Biology*. 12: 2708-19 (1992)
- [185] Fujiwara, J; Kimura, T; Ayusawa, D; Oishi, M. A novel regulatory sequence affecting the constitutive expression of tissue plasminogen activator (tPA) gene in human melanoma (Bowes) cells. *Journal Of Biological Chemistry*. 269: 18558-62 (1994)

- [186] Surinya, K H; Cox, T C; May, B K. Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in intron 8 of the human 5-aminolevulinate synthase 2 gene. *Journal Of Biological Chemistry*. 273: 16798-809 (1998)
- [187] Lavorgna, G; Dahary, D; Lehner, B; Sorek, R; Sanderson, C M; Casari, G. In search of antisense. *Trends In Biochemical Sciences*. 29: 88-94 (2004)
- [188] Coudert, A E; Pibouin, L; Vi-Fane, B; Thomas, B L; Macdougall, M; Choudhury, A; Robert, B; Sharpe, P T; Berdal, A; Lezot, F. Expression and regulation of the Msx1 natural antisense transcript during development. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 33: 5208-18 (2005)
- [189] Kovalskaya, E; Buzdin, A; Gogvadze, E; Vinogradova, T; Sverdlov, E. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*. 346: 373-8 (2006)
- [190] Harris, N L; Senapathy, P. Distribution and consensus of branch point signals in eukaryotic genes: a computerized statistical analysis. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 18: 3015-9 (1990)
- [191] Kozak, M. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genome*. 7: 563-74 (1996)
- [192] Chen, J; Sun, M; Kent, W J; Huang, X; Xie, H; Wang, W; Zhou, G; Shi, Run Z; Rowley, J D. Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucl. Med. Commun.nucleic Acids Research*. 32: 4812-20 (2004)

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen, die mir während meiner Promotionszeit zur Seite standen, bedanken.

- Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller, ohne den diese Arbeit nicht entstanden wäre. Über die Bereitstellung des Themas und Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik habe ich mich sehr gefreut. Auch für seine Hilfe bei der Korrektur der Dissertation möchte ich mich recht herzlich bedanken.
- Mein Dank gilt auch Frau PD Dr. Dagmar Nolte, die mir bei der Durchführung der Experimente stets beiseite stand. Auch die zahlreichen Diskussionen werde ich in guter Erinnerung behalten.
- Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz für die Begutachtung der Dissertation bedanken. Auch die Möglichkeit das Luminometer des Instituts für Genetik benutzen zu dürfen hat mir sehr geholfen.
- An dieser Stelle möchte ich mich bei allen anderen Kolleginnen bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hier Frau Dr. Julia Kress und Frau Pia Winter, die stets ihre Hilfe angeboten haben. Dafür bin ich sehr dankbar.
- Bei meinen Eltern möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung bedanken. Es ist schön euer Sohn zu sein.
- Meine Liebe gehört meiner Frau Stephanie und meinen beiden Kindern Jesko und Leni. Ohne den Rückhalt meiner Familie hätte ich es nicht geschafft.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thilo Herzfeld, geboren am 11.03.1976 in München, dass ich die vorliegende Dissertation, gemäß der Promotionsordnung vom 05.02.1990 für die Verleihung des Dr. rer. nat. durch die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen, selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen Quellen benutzt habe.

Gießen, den 20.09.2006

Thilo Herzfeld

